

O papel do córtex pré-frontal medial no processamento de *working memory*: estimulação optogenética local e modulação farmacológica dos recetores de dopamina D2 para a reversão de défices

Pedro Miguel Coelho Paiva

Mestrado em Bioquímica

Departamento de Química e Bioquímica

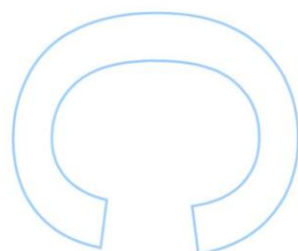
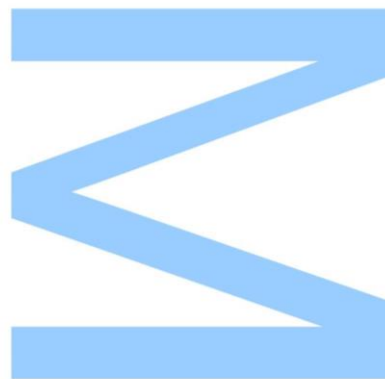
2014

Orientador

Helder Rui Cardoso da Cruz, PhD, Faculdade de Medicina da
Universidade do Porto

Coorientador

Vasco Miguel Clara Lopes Galhardo, PhD, Faculdade de Medicina da
Universidade do Porto

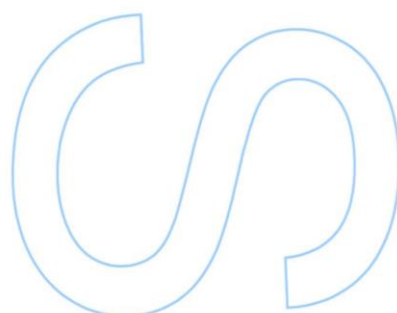
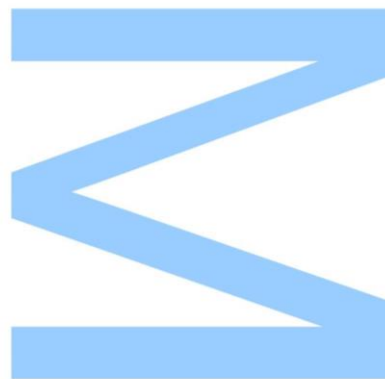




Todas as correções determinadas
pelo júri, e só essas, foram efetuadas.

O Presidente do Júri,

Porto, ____/____/____



*“A descoberta consiste em ver o que todos viram
e em pensar no que ninguém pensou.”*

Albert Szent-Gyorgyi (1893 – 1986)

Agradecimentos

Ao Doutor Helder Cardoso-Cruz, pela orientação, sugestões, disponibilidade, paciência e profissionalismo demonstrados ao longo de todo o trabalho, fundamentais para o desenvolvimento das minhas aptidões científicas e para o meu crescimento enquanto profissional.

Ao Professor Doutor Vasco Galhardo, pelas sugestões e oportunidade de investigar no laboratório por si liderado, dotado de um excelente ambiente de trabalho e de uma equipa de admiráveis pessoas e profissionais.

Às colegas de laboratório Doutora Clara Monteiro e Dra. Margarida Dourado, pelos conselhos, disponibilidade, paciência e conhecimentos transmitidos. O vosso apoio foi fundamental para a minha integração, bem como para o alargamento e afinação das minhas técnicas experimentais, transversais a todas as etapas do plano de trabalho. Também à Dra. Mafalda Sousa, pela boa disposição e conselhos transmitidos.

A todos os meus colegas que, comigo, percorreram um desafiante mas bem sucedido percurso académico. Um especial obrigado à Rita Costa e Inês Rodrigues, pelas longas conversas, momentos de estudo e forte amizade, que perdurará para sempre.

A todos os meus amigos que, quer direta ou indiretamente, contribuíram para o meu sucesso académico.

Às pessoas que constituem a essência do meu ser:

- Ana Luís, por seres o meu apoio constante e porto seguro. Pelo carinho e energia transmitida. Dás brilho à minha vida e só assim é que esta faz sentido. Obrigado por tudo!
- Hugo, pelo apoio incondicional, boa disposição e exemplo. Sinto-me honrado e orgulhoso por ser teu irmão!
- Bárbara, a minha “irmã” mais recente, pelo carinho, apoio e preocupação!
- Pais, por toda a dedicação, paciência, sacrifício e amor. Obrigado pelos valores que me transmitiram e que sustentam o meu ser. Tudo o que tenho e sou devo-o a vocês. Um eterno obrigado, pais!

- II | FCUP/ICBAS
O papel do córtex pré-frontal medial no processamento de *working memory*: estimulação optogenética local e modulação farmacológica dos recetores de dopamina D2 para a reversão de défices

Resumo

O córtex pré-frontal (PFC) desempenha um papel chave em funções cognitivas como a atenção, tomada de decisão e *working memory* (WM), comprometidas em condições dolorosas persistentes. A dopamina (DA) tem uma especial importância na neuromodulação da atividade do PFC e a deficiente sinalização dopaminérgica nesta estrutura está correlacionada com a manifestação de défices cognitivos, observáveis durante a persistência de síndromes dolorosas. Apesar de ter sido demonstrada a perturbação dos circuitos neuronais e da sinalização dopaminérgica pré-frontais em condições dolorosas persistentes, são ainda desconhecidos os mecanismos responsáveis pelo desequilíbrio funcional do PFC nestas situações. O atual projeto foi desenhado para, numa primeira tarefa, investigar os efeitos da modulação optogenética do PFC na estabilidade dos circuitos neuronais envolvidos no processamento da WM, e numa segunda tarefa, estudar o papel dos recetores de dopamina D2 nos processos de WM em condições dolorosas persistentes. Para a primeira tarefa, induziu-se a expressão das opsinas ChR2 (excitatória) e NpHR (inibitória) em neurónios piramidais do mPFC de ratos para subsequente estimulação optogenética. Para a segunda tarefa, a modulação dos recetores de dopamina D2 foi realizada pela administração sistémica de raclopride (antagonista DA D2) no modelo animal de dor neuropática periférica por lesão do nervo ciático (*Spared-Nerve Injury* – SNI). A performance de WM destes animais foi avaliada numa tarefa *2-lever non-match choice (delayed non-matching to sample)* com dois tempos de espera entre-ensaios (3 e 6 segundos), em simultâneo com a estimulação optogenética (Tarefa 1) e registos eletrofisiológicos (Tarefa 1 e 2). Para ambas as tarefas, foi observado um aumento dos erros cometidos para intervalos de espera entre-ensaios superiores. Nestes casos, estimulação optogenética inibitória de neurónios piramidais durante o período inter-ensaios elevou os níveis de performance de WM e a taxa de disparo populacional pré-frontal durante a correta seleção da alavanca que desbloqueia a recompensa. Em animais SNI, a administração sistémica de raclopride gerou melhorias na performance de WM e fez elevar a atividade neuronal no instante em que uma correta decisão foi realizada. Juntos, estes resultados sugerem que a modulação da atividade de neurónios piramidais, bem como do balanço dopaminérgico pré-frontal podem constituir importantes vias de atuação que procurem a reversão de défices de WM associados à persistência de síndromes dolorosas.

Palavras-chave: córtex pré-frontal medial, *working memory*, dopamina, dor crónica neuropática, optogenética, eletrofisiologia.

IV | FCUP/ICBAS
O papel do córtex pré-frontal medial no processamento de *working memory*: estimulação optogenética local e modulação farmacológica dos recetores de dopamina D2 para a reversão de défices

Abstract

The prefrontal cortex (PFC) plays a key role in several cognitive functions including attention, decision-making and working memory (WM), which are impaired during persistent painful conditions. In this regard, dopamine (DA) also exerts an important role in PFC activity neuromodulation, and the disruption of prefrontal dopaminergic transmission is thought to be one of leading causes to explain pain-related WM deficits. Despite all the knowledge regarding the disruption of prefrontal neuronal local circuits and dopaminergic signaling in painful conditions, the mechanisms responsible for this functional unbalance remains unclear. This project aims to investigate the effects caused by optogenetic modulation of PFC local neuronal circuits involved in WM processes (task I), and the role of the dopamine D2 receptors in WM performance during painful conditions (task II). In task I, for the local optogenetic stimulation, an excitatory (ChR2) and an inhibitory (NpHR) opsins were expressed in mPFC pyramidal cells. In task II, the dopamine D2 receptors activity were modulated by systemic administration of raclopride (DA D2 antagonist), and evaluated before and after the induction of an animal model of neuropathic pain - *spared-nerve injury* (SNI). The spatial WM performance was evaluated in a 2-lever delayed non-matching to sample task with two different delay periods, and simultaneously was recorded the electrophysiological mPFC activity during cognitive demand. Our results showed that the number of error trials increased for longer inter-trial delays. In those conditions, inhibitory optogenetic stimulation of mPFC pyramidal cells during the delay period increased WM performance, and it was also observed an increase of populational firing activity signature close to free-choice lever press during correct trials. In SNI animals, the systemic administration of raclopride also improved WM performance and raised the prefrontal neuronal activity at the lever-press event when a correct choice is made. Together, these results suggest that the modulation of pyramidal cells activity and dopaminergic balance in prefrontal network may be an important approach for the reversal of pain-related working memory deficits.

Keywords: medial prefrontal cortex, working memory, dopamine, neuropathic pain, optogenetics, electrophysiology.

VI | FCUP/ICBAS
O papel do córtex pré-frontal medial no processamento de *working memory*: estimulação optogenética local e modulação farmacológica dos recetores de dopamina D2 para a reversão de défices

Índice

LISTA DE FIGURAS E TABELAS	IX
LISTA DE ABREVIATURAS	XI
INTRODUÇÃO	1
1 - O córtex pré-frontal	3
1.1 - Propriedades anatómicas e estrutura celular	3
1.2 - Interações fronto-cortico-hipocampus	4
2 - O papel do córtex pré-frontal nas funções cognitivas	5
2.1 - Avaliação da performance de <i>working memory</i> em roedores	6
2.2 - A importância do córtex pré-frontal no desempenho da <i>working memory</i>	7
2.3 - Papel da dor crónica no desenvolvimento de défices de <i>working memory</i>	8
2.4 - O papel da modulação dopaminérgica na atividade do córtex pré-frontal e nos défices de <i>working memory</i>	12
2.5 - Papel da dopamina na modulação dos sinais nociceptivos	14
3 - Modulação da atividade do córtex pré-frontal medial	15
4 - Objetivos do trabalho	18
METODOLOGIA	19
1 - Modelo animal	21
2 - Paradigma comportamental e plano de treinos	21
3 - Implantação cirúrgica de matrizes de microelétrodos intracranianos e de um implante de fibra ótica	22
Tarefa 1 - Modulação optogenética da atividade pré-frontal na execução de uma tarefa de <i>working memory</i>	23
Tarefa 2 - Estudo do efeito da modulação dos recetores de dopamina D2 na performance de <i>working memory</i> num modelo animal de dor neuropática	24
4 - Indução do modelo de dor neuropática – <i>Spared-nerve injury</i>	24
5 - Protocolos experimentais	26
Tarefa 1 - Estimulação optogenética do mPFC	26
Tarefa 2 - Modulação dos recetores de dopamina D2	27
6 - Registos eletrofisiológicos	28
7 - Histologia	28
8 - Análise de dados	29
Atividade de disparo neuronal	29

RESULTADOS	31
Tarefa 1: Modulação optogenética da atividade pré-frontal na execução de uma tarefa de <i>working memory</i>	33
1.1 – Validação da expressão das opsinas ChR2 e NpHR em células piramidais do córtex pré-frontal medial	33
1.2 – Avaliação da atividade neuronal em resposta à estimulação optogenética	34
1.3 – Efeito da estimulação optogenética de neurónios piramidais pré-frontais na performance de <i>working memory</i>	36
Tarefa 2 – Estudo do efeito da modulação dos recetores de dopamina D2 na performance de <i>working memory</i> num modelo animal de dor neuropática	39
2.1 – Avaliação dos níveis de <i>threshold</i> mecânico dos grupos experimentais	39
2.2 – Efeito do raclopride na performance comportamental de <i>working memory</i>	39
DISCUSSÃO	43
CONSIDERAÇÕES FINAIS	49
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	53

Lista de figuras e tabelas

Figuras

Figura 1 – <i>Channelrhodopsin</i> (ChR) e <i>Halorhodopsin</i> (HR).	16
Figura 2 – Diagrama do paradigma <i>2-lever non-match choice</i> comportamental utilizado no presente estudo e da respetiva sequência lógica de resolução.	22
Figura 3 – O nervo ciático em roedores: ramos terminais respetivas enervações da pata posterior.	25
Figura 4 – Cronograma experimental das experiências de estimulação optogenética (Tarefa 1).	27
Figura 5 – Cronograma experimental das experiências de modulação dos recetores de dopamina D2 (Tarefa 2).	28
Figura 6 – Validação do local de injeção viral e da expressão das opsinas no mPFC por microscopia de campo claro e fluorescência.	33
Figura 7 – Célula piramidal expressa as opsinas excitatória e inibitória.	34
Figura 8 – Efeitos da estimulação optogenética no padrão de atividade de um neurónio piramidal do mPFC.	35
Figura 9 – Efeito da estimulação optogenética do mPFC na performance de WM.	37
Figura 10 – Atividade neuronal peri-evento em ensaios corretos ou incorretos com intervalo de espera de 6 segundos.	38
Figura 11 – Nível de sensibilidade mecânica medido pela resposta à estimulação com monofilamentos de von Frey.	39
Figura 12 – Efeito da administração de raclopride na performance comportamental.	40
Figura 13 – Atividade populacional peri-evento em ensaios corretos e incorretos.	41

Tabelas

Tabela 1 – Compilação dos principais estudos de avaliação da performance de <i>working memory</i> em modelos animais de dor.	10
---	-----------

X | FCUP/ICBAS
O papel do córtex pré-frontal medial no processamento de *working memory*: estimulação optogenética local e modulação farmacológica dos recetores de dopamina D2 para a reversão de défices

Lista de abreviaturas

AAV	<i>Adeno-associated virus</i>
ANOVA	Análise de variância
CaMKII	Proteína cinase II dependente de cálcio/calmodulina
CFA	Modelo de dor inflamatória induzido pelo adjuvante completo de Freund
ChR2	<i>Channelrhodopsin-2</i>
Cl⁻	Anião cloreto
DA	Dopamina
DMS	<i>Delayed matching to sample</i>
DNMS	<i>Delayed non-matching to sample</i>
DV	Dorso-vental
eYFP	Proteína fluorescente amarela
GABA	Ácido <i>gamma</i> -aminobutírico
IL	Infralímbico
IP	Intraperitoneal
KS	Kolmogorov-Smirnoff
LED	Díodo emissor de luz
ML	Médio-lateral
mPFC	Córtex pré-frontal medial
Na⁺	Catão sódio
NaCl	Cloreto de sódio
NpHR	<i>Halorhodopsin</i>
PFA	Paraformaldeído
PFC	Córtex pré-frontal
PL	Pré-límbico
PV	Interneurónios que expressam parvalbumina
RC	Rostro-caudal
SNI	Modelo de dor neuropática periférica induzido por lesão do nervo ciático
TTL	Lógica transístor-transístor
USB	<i>Universal Serial Bus</i>
WM	<i>Working memory</i>

XII | FCUP/ICBAS

O papel do córtex pré-frontal medial no processamento de *working memory*: estimulação optogenética local e modulação farmacológica dos recetores de dopamina D2 para a reversão de défices

INTRODUÇÃO

- 2 | FCUP/ICBAS
O papel do córtex pré-frontal medial no processamento de *working memory*: estimulação optogenética local e modulação farmacológica dos recetores de dopamina D2 para a reversão de défices

1 - O córtex pré-frontal

1.1 - Propriedades anatómicas e estrutura celular

O córtex pré-frontal (PFC), córtex de associação do lobo frontal, constitui o mais elevado nível da hierarquia cortical dedicada à representação e execução de ações (Fuster, 2001). Esta estrutura abrange um conjunto de áreas neocorticais que apresentam uma complexa e sobreposta rede de interligações com diversos sistemas sensoriais e motores neocorticais e várias estruturas subcorticais. Do ponto de vista anatómico, o cérebro de primatas compreende as áreas 8-13, 24, 32, 46 e 47, de acordo com o mapa citoarquitetónico de Brodmann (1909), e está subdividido em três regiões: orbital, medial e lateral (ou dorsolateral). As divisões orbital e medial desempenham um papel relevante no comportamento emocional e a região dorsolateral em funções executivas (Barbas *et al.*, 1995; Ongur *et al.*, 2000; Fuster, 2001). Nos roedores, o PFC pode ser dividido em três regiões distintas no que respeita à sua topologia: o córtex pré-frontal medial (mPFC), o córtex pré-frontal orbital e o córtex insular agranular (Heidbreder *et al.*, 2003). O mPFC dos roedores, área cortical homóloga à região dorsolateral do PFC de primatas em termos de ligações anatómicas, compreende quatro divisões distintas em termos citoarquitetónicos que, de uma posição dorsal para ventral, se denominam: agranular medial (ou pré-central medial), córtex cingulado anterior, pré-límbico (PL) e infralímbico (IL) (Ongur *et al.*, 2000; Heidbreder *et al.*, 2003). A diferença mais significativa entre o PFC de primatas e roedores reside no facto de o PFC de roedores não apresentar nenhuma camada granular óbvia e o de primatas exibir uma camada granular bem definida (camada IV). As regiões dorsais do mPFC estão associadas a vários comportamentos motores, estando as regiões ventrais (PL e IL) associadas a processos cognitivos, mnemónicos e emocionais (Heidbreder *et al.*, 2003). Estudos apontam para a existência de uma homologia funcional entre as regiões orbito-medial e dorsolateral de primatas e as regiões IL e PL do mPFC do rato (Vertes, 2006), ao nível do controlo dos aspetos emocionais e cognitivos do comportamento.

Ao nível da arquitetura da estrutura celular, o PFC é composto por duas populações neuronais: cerca de 70-80% são neurónios piramidais glutamatérgicos excitatórios e 20-30% de interneurónios GABAérgicos inibitórios (Douglas *et al.*, 1990; Gabbott *et al.*, 1997). Os circuitos intracorticais pré-frontais derivam da colateralidade entre os axónios dos neurónios piramidais e as arborizações axonais locais dos interneurónios GABAérgicos inibitórios (Douglas *et al.*, 1990). De acordo com Swanson, o mPFC de roedores é constituído por cinco camadas (Swanson, 2003). A camada I é a mais superficial e contém os corpos celulares dos interneurónios inibitórios e as dendrites

dos neurónios piramidais. As camadas II e III compreendem os corpos celulares de neurónios piramidais pequenos e de tipos distintos de interneurónios, e as camadas V e VI exibem neurónios piramidais de grandes dimensões (cujos axónios projetam para estruturas subcorticais) e grupos de interneurónios. Apesar de existirem diversos tipos de neurónios piramidais, com distintos locais de projeção, estes exibem uma morfologia relativamente uniforme. São dotados de dendrites basais e apicais e axónios primários com orientação para a substância branca cerebral (DeFelipe *et al.*, 1992). Ao nível funcional, os neurónios piramidais são ainda importantes para a integração e transferência de informação de *inputs* extracorticais e dos circuitos locais para zonas corticais distantes e estruturas subcorticais (Degenetais *et al.*, 2002).

Os interneurónios GABAérgicos corticais exibem maior heterogeneidade e são diferenciados dos neurónios piramidais pelas suas características morfológicas, neuroeletrofisiológicas, ligações a circuitos específicos e distintos padrões de expressão proteica (Markram *et al.*, 2004; Povysheva *et al.*, 2006; Van De Werd *et al.*, 2010). Nesse sentido, os interneurónios que apresentam as proteínas de ligação calbindina ou calreticulina têm como alvo principal as dendrites distais dos neurónios piramidais; os que expressam parvalbumina (PV) realizam, essencialmente, sinapses com o segmento inicial do axónio e com dendrites proximais ao corpo celular de neurónios piramidais, estando por essa razão numa melhor posição para regular o disparo de neurónios piramidais (Homayoun *et al.*, 2007). Os interneurónios PV exibem uma elevada taxa de disparo basal, justificada pelos múltiplos *inputs* excitatórios que recebem. Ao nível morfológico, exibem uma arborização axonal bastante ampla, capaz de realizar sinapses com mais de 200 neurónios piramidais, tornando possível a inibição da taxa de disparo de elevados grupos de aferentes corticais (Cobb *et al.*, 1995). Apesar de apenas constituírem uma baixa porção da população neuronal cortical, os interneurónios GABAérgicos são elementos críticos para a regulação da atividade neuronal cortical. Nesse sentido, o bloqueio de recetores GABA no PFC provou estar associado a perturbações na atividade dos neurónios piramidais pré-frontais e à exibição de défices na performance cognitiva, sensorial e motora (Rao *et al.*, 2000a; Constantinidis *et al.*, 2002).

1.2 - Interações fronto-cortico-hipocampais

A área ventral do mPFC (PL/IL) estabelece ligações com estruturas do sistema límbico, como o núcleo *accumbens*, amígdala, porção medial do tálamo e áreas dispersas do hipocampo e tronco cerebral (Room *et al.*, 1985; Sesack *et al.*, 1989; Hurley *et al.*, 1991; Conde *et al.*, 1995; Gabbott *et al.*, 2005).

Contrariamente à região IL, a PL envia poucas projeções para locais relacionados com a atividade visceral, sendo os seus alvos principais as estruturas associadas a comportamentos cognitivos (Vertes, 2004). Vários estudos realizados em diversas espécies demonstraram a existência de projeções da formação hipocampal para o mPFC (Cavada *et al.*, 1983; Goldman-Rakic *et al.*, 1984; Jay *et al.*, 1989). No rato, os eferentes hipocampais para o mPFC provêm do *subiculum* e dos aspetos temporais da zona CA1 do hipocampo e estabelecem conexões monossinápticas com a região dorsal do mPFC (através do córtex cingulado) e polissinápticas com as regiões PL e IL pré-frontais, pelo tálamo médio-dorsal e amígdala (Vertes, 2006). Não se verifica a existência de projeções das áreas CA2/CA3 ou do giro dentado para o mPFC (Jay *et al.*, 1991).

Os neurónios da formação hipocampal formam sinapses assimétricas (excitatórias) com os neurónios piramidais do mPFC, exercendo um efeito excitatório nesta população celular (Laroche *et al.*, 1990; Carr *et al.*, 1996). Por outro lado, a via hipocampo-mPFC estabelece contactos sinápticos excitatórios com interneurónios PV do mPFC, promovendo processos de inibição por *feedforward* da atividade da população piramidal do mPFC (Gabbott *et al.*, 2002; Tierney *et al.*, 2004). Apesar de receber inúmeras projeções oriundas do hipocampo, o mPFC não emite projeções diretas para a formação hipocampal (Goldman-Rakic *et al.*, 1984; Reep *et al.*, 1987; Buchanan *et al.*, 1994).

2 - O papel do córtex pré-frontal nas funções cognitivas

Estudos em animais e humanos corroboram a noção de que o PFC está associado à coordenação de funções cognitivas e executivas como o planeamento e tomada de decisão (Bechara *et al.*, 1994), a atenção (Passetti *et al.*, 2000; Passetti *et al.*, 2002), a versatilidade comportamental (Miner *et al.*, 1997) e a *working memory* (WM) (Fuster, 1990; Goldman-Rakic, 1990).

A WM, também designada por memória a curto prazo, consiste num sistema de retenção de informação relevante em curtos intervalos de tempo para a execução de uma ação (Baddeley, 1986). Este tipo de memória pode estar associado a estímulos sensoriais simples, a objetos ou associada à localização espacial. Esta capacidade é crucial para a execução de diversos tipos de tarefas cognitivas. Para além do PFC, o hipocampo também está envolvido nas tarefas de WM, em particular em tarefas que envolvem intervalos longos de tempo de retenção da memória. A aplicação de lesões ao dessas duas estruturais cerebrais permitiu comprovar que a formação hipocampal desempenha um papel importante na fase inicial da aprendizagem de tarefas

comportamentais por roedores, não afetando as fases finais do processo de aprendizagem. O inverso acontece quando lesionado o mPFC, havendo lugar a um défice da curva de aprendizagem na fase final, e não na inicial. O mPFC e o hipocampo são duas das regiões mais importantes na codificação de WM (Goldman-Rakic, 1994; Floresco *et al.*, 1997; Baeg *et al.*, 2003). Essas regiões interagem através de oscilações coerentes na banda de frequência *theta* (4-10 Hz) (Hyman *et al.*, 2005; Siapas *et al.*, 2005), durante as quais os neurónios do mPFC alternam entre padrões de disparo em fase e não fase, dependendo do contexto comportamental (Jones *et al.*, 2005). Essas interações são mais evidentes no período que precede a tomada de uma decisão e diminuem no ponto de decisão quando são tomadas decisões erradas (Hyman *et al.*, 2010; Cardoso-Cruz *et al.*, 2013a). Este tipo de padrões de atividade representa uma forte evidência para conexão funcional entre ambas as regiões. A atividade *theta* fronto-hipocampal é coordenada por oscilações em *gamma* (50-100 Hz), responsáveis pela sinalização de janelas temporais para a integração e transmissão de informação entre o PFC e o hipocampo (Lisman, 2010).

Uma vez estabelecido o conceito de WM, foram desenvolvidos paradigmas comportamentais com o objetivo de avaliar este tipo de memória em modelos animais e de clarificar o papel do mPFC nesta função cognitiva.

2.1 - Avaliação da performance de *working memory* em roedores

Atualmente, existem várias tarefas comportamentais que permitem avaliar a WM espacial, sendo as mais comuns os paradigmas Morris *Water Maze*, *delayed alternation*, *radial arm maze*, *delayed matching to sample* (DMS) e *delayed non-matching to sample* (DNMS).

O paradigma Morris *Water Maze* requer que o roedor navegue para uma plataforma submersa (oculta) num reservatório circular com água (Morris, 1981). Na sua versão original, a plataforma submersa permanece na mesma localização do reservatório no decorrer das experiências e os animais resolvem o paradigma pela aprendizagem das relações espaciais entre a localização da plataforma e as marcas extra-arena no local teste.

As tarefas de *delayed alternation* tiram proveito da tendência que os roedores exibem em optar por trajetórias alternativas quando reexpostos à mesma tarefa após um período de espera (*delay*). Neste tipo de tarefas, as arenas mais utilizadas são os Y- e T-*maze* (Tolman, 1925; Dudchenko, 2004). Outro dos paradigmas também frequentemente utilizado é o *radial-arm maze* (Olton, 1976), cujas arenas são tradicionalmente constituídas por oito braços/corredores que convergem numa plataforma central. Neste

tipo de tarefas os animais dependem da sua memória espacial para evitar revisitar os braços já visitados. Nestas tarefas são utilizadas referências espaciais dentro e fora da arena para facilitar a orientação dos animais durante a performance comportamental.

As tarefas do tipo DMS e DNMS são compostas por um *forced-trial*, em que é apresentado um único estímulo ao animal que terá que recordar durante um intervalo de tempo. Terminado esse tempo, tem início o *free-choice trial*, no qual são apresentados o estímulo inicial, bem como um alternativo. Em tarefas do tipo DMS, o animal deve optar pelo estímulo inicial de modo a receber reforço positivo (recompensa). Em contraste, nas tarefas do tipo DNMS o animal deve optar pelo estímulo alternativo (Hunter, 1913; Dudchenko, 2004). Ambas as tarefas têm a vantagem de o investigador poder especificar o estímulo a ser lembrado e controlar a complexidade da tarefa através da regulação do tempo de espera entre-ensaios. Nesse sentido, em condições *naïve*, existe uma relação inversamente proporcional entre o aumento da duração do intervalo (entre o ensaio *forced* e *free-choice*) e a performance comportamental de WM (Lee *et al.*, 2003; Rossi *et al.*, 2012).

Para além das tarefas anteriores, existem paradigmas de avaliação da WM cujo intervalo entre-ensaios é variável (não determinado pelo investigador). Uma das tarefas mais utilizadas é o *Figure-8 spatial alternation maze* (Jung *et al.*, 1998), no qual o animal inicia o ensaio no centro da arena e tem que visitar, alternadamente, dois locais de recompensa. Após visitar um desses locais, o animal deve continuar o seu percurso utilizando uma trajetória oposta à de aproximação do local de recompensa visitado e atravessar novamente o corredor central para alcançar o segundo local de recompensa. Nesta tarefa, a performance do animal depende da sua capacidade de manter em memória o histórico da trajetória utilizada para alcançar o último local de recompensa visitado, enquanto navega em direção ao futuro local de recompensa..

2.2 - A importância do córtex pré-frontal no desempenho da *working memory*

O papel pivotal do PFC ao nível de processos executivos é apoiado por estudos em primatas (Goldman, 1970) e roedores (Shaw *et al.*, 1993; Kyd *et al.*, 2003), que provaram que a lesão desta estrutura cerebral está correlacionada com uma quebra da performance cognitiva. O mesmo efeito na performance também foi observado em estudos onde se procedeu à inativação farmacológica temporária do mPFC e hipocampo. A inativação transiente do PFC pela lidocaína está associada a um aumento do número de erros cometidos durante a execução do paradigma *8-arm radial maze*, sugerindo que o PFC exibe um papel essencial para o correto desempenho em tarefas de WM espacial (Seamans *et al.*, 1995; Floresco *et al.*, 1997). Relativamente à inativação temporária do

PFC pela injeção local de muscimol (agonista dos recetores GABA-A), vários estudos demonstraram a redução do desempenho, associada ao aumento do número de erros cometidos e à redução de ensaios iniciados e de recompensas recebidas, em paradigmas comportamentais de WM distintos como o *8-arm radial maze* (Lee *et al.*, 2003), *T-maze* (Wang *et al.*, 2006), *Figure-8 spatial alternation maze* (Yoon *et al.*, 2008), DNMS (Rossi *et al.*, 2012) e *Y-maze* (Yang *et al.*, 2014). Estes estudos reportaram que a inativação bilateral do PFC e a inativação unilateral do hipocampo em simultâneo com a inativação do PFC contralateral geram notáveis défices de WM espacial, explicitando a importância do circuito fronto-hipocampal neste domínio cognitivo.

2.3 - Papel da dor crónica no desenvolvimento de défices de *working memory*

A aprendizagem e memória de pacientes com dor crónica neuropática têm sido alvo de investigação. Os resultados destes estudos demonstram uma fraca prestação de pacientes com, entre outras, fibromialgia (Park *et al.*, 2001; Luerding *et al.*, 2008; Kim *et al.*, 2012), lesão cerebral traumática (McDowell *et al.*, 1997) e dor crónica de articulações e/ou membros (Dick *et al.*, 2007), em parâmetros de avaliação relacionados com a WM. Foi demonstrado que os pacientes com fibromialgia exibem défices ao nível da atenção, da WM verbal e não verbal (Luerding *et al.*, 2008), bem como da WM espacial (Kim *et al.*, 2012). Dick *et al.* (2007) reportaram que pacientes com dor crónica em articulações ou membros são afetados por défices da WM espacial, sendo que cerca de 2/3 dos participantes do estudo clínico apresentaram esta consequência. Outro estudo clínico, realizado com 25 pacientes com lesão cerebral traumática, evidenciou o comprometimento da performance num paradigma de WM, bem como de outras capacidades associadas à função executiva (McDowell *et al.*, 1997).

Várias teorias procuram explicar a ocorrência destes défices cognitivos, de um modo particular os que afetam a memória, em situações de dor persistente. Hart *et al.* (2000) sugerem que substâncias químicas produzidas num estado de dor crónica podem influenciar a função dos circuitos neuronais envolvidos em distintos processos cognitivos, conduzindo ao seu comprometimento. Por outro lado, Eccleston (1994) propõe que a atenção (capacidade cognitiva relevante para a WM) constitui um recurso finito e que os estímulos internos relacionados com a dor persistente competem com esta para os seus limitados recursos, comprometendo os processos de WM que envolvem o processamento e integração de informação relacionada com a tarefa a executar.

A dificuldade em estabelecer grupos de pacientes com características idênticas, aliada ao facto de estes serem alvo de extensos programas farmacológicos podem

influenciar as conclusões retiradas destes estudos clínicos. No entanto, tal situação não explica o facto de que em modelos animais de dor, em que as condições de experimentação (como, por exemplo, a idade, carga farmacológica, tipo de dor induzida) são controláveis pelo investigador, são reportados défices cognitivos (Moriarty *et al.*, 2011), acompanhados por alterações ao nível dos circuitos neuronais.

De entre os modelos animais de dor desenvolvidos, o modelo de dor neuropática *Spared Nerve Injury* (SNI) toma especial relevância graças à fácil execução experimental, elevada reprodutibilidade entre animais, robustez e estabilidade numa escala temporal alargada, bem como às suas similaridades face a quadros clínicos de dor neuropática (Decosterd *et al.*, 2000). Por outro lado, é importante mencionar que a lesão induzida neste modelo é pouco severa e não compromete a função locomotora do animal, o que constitui uma enorme vantagem quando se procura avaliar a função cognitiva de índole espacial, na qual um animal tem que navegar pela arena comportamental de teste.

A Tabela 1 compreende os principais estudos pré-clínicos em que foram observados défices de WM associados a diferentes condições dolorosas, em parte associadas a alterações funcionais e morfológicas no PFC. Perturbações de outras funções cognitivas, como a avaliação de risco e decisão (Pais-Vieira *et al.*, 2009; Ji *et al.*, 2010) e aversão (Suzuki *et al.*, 2007), foram também observadas em modelos animais de dor.

Os estudos desenvolvidos por Cain *et al.* (1997) e Lindner *et al.* (1999) em roedores demonstraram uma evidente redução da performance num paradigma *delayed non-matching to position*, após a injeção da forma completa do adjuvante de Freund (CFA) (Butler *et al.*, 1992), uma condição indutora de um estado de dor inflamatória. Como tal, os animais que até à data de injeção de CFA não apresentavam défices nesta tarefa (sensível a défices de atenção, aprendizagem e memória), passaram a cometer mais erros, situação agravada com o aumento do intervalo de espera. Um outro estudo realizado num modelo animal de dor neuropática reportou um decréscimo da memória espacial deste modelo face ao controlo, essencialmente em animais numa faixa etária média (aproximadamente 9 meses de idade) (Leite-Almeida *et al.*, 2009). A redução da função da memória espacial foi constatada pelo aumento da percentagem de distância navegada no paradigma *Morris Water Maze* perto da plataforma anterior e pela redução da percentagem de distância navegada nas imediações da nova plataforma.

Tabela 1 – Compilação dos principais estudos de avaliação da performance de *working memory* em modelos animais de dor.

Animal	Modelo de dor	Paradigma Comportamental	Domínios cognitivos	Principais resultados	Referência
Rato	CFA	DNMTP	Atenção, aprendizagem e memória	Redução da performance comportamental, traduzida no aumento do número de erros cometidos	(Cain <i>et al.</i> , 1997)
Rato	CFA	DNMTP	Atenção, aprendizagem e memória	Aumento do tempo despendido na execução da tarefa e do número de erros cometidos	(Lindner <i>et al.</i> , 1999)
Rato	SNI	<i>Morris water maze</i>	Aprendizagem e memória espacial	Redução da distância percorrida nas imediações da nova plataforma e aumento da distância percorrida no local da plataforma anterior	(Leite-Almeida <i>et al.</i> , 2009)
Rato	Secionamento do nervo espinhal L5	<i>Morris water maze</i>	Aprendizagem e memória espacial	Redução da função de aprendizagem e memória (associada à redução da frequência na zona da plataforma durante a sessão teste)	(Hu <i>et al.</i> , 2010)
Rato e ratinho	SNI	8-arm radial maze	<i>Working memory</i> e memória de referência	Aumento do número de erros de <i>working memory</i> em animais SNI com e sem alodinia mecânica;	(Ren <i>et al.</i> , 2011)
Rato	SNI	<i>Figure-8 spatial alternation e T-maze</i>	<i>Working memory</i> espacial	Redução do número de ensaios realizados pelos animais SNI; Aumento do tempo de alternação e navegação na <i>delay-zone</i> ; Redução da performance em ambos os paradigmas. Redução da conectividade fronto-hipocampal	(Cardoso-Cruz <i>et al.</i> , 2013a)
Rato	CFA	<i>Figure-8 spatial alternation</i>	<i>Working memory</i> espacial	Aumento do tempo de alternação e navegação na <i>delay-zone</i> ; Redução do número de ensaios realizados pelos animais CFA e da performance de WM espacial; Redução da conectividade mPFC-tálamo médiodorsal	(Cardoso-Cruz <i>et al.</i> , 2013b)
Rato	SNI	<i>Figure-8 spatial alternation</i>	<i>Working memory</i> espacial	Redução da performance de WM espacial e do número de ensaios realizados pelo modelo animal de lesão do nervo ciático	(Cardoso-Cruz <i>et al.</i> , 2014)

Abreviaturas: CFA: *complete Freund's adjuvant*; SNI: *Spared Nerve Injury*; DNMT: *Delayed non-matching to position*; WM: *working memory*.

Recorrendo ao mesmo paradigma comportamental, Hu *et al.* (2010) demonstraram que o seccionamento do nervo espinhal L5 induziu uma condição dolorosa neuropática que, por sua vez, resultou no desenvolvimento de alodínia mecânica, depressão e redução da função de aprendizagem e memória. Ren *et al.* (2011) demonstraram um decaimento da performance de WM de roedores num paradigma *8-arm radial maze* após indução de dor neuropática pelo modelo SNI. Foi notável o aumento do número médio de erros cometidos na execução da tarefa comportamental por animais SNI, com e sem alodínia mecânica, comparativamente com o grupo *sham* (grupo de animais sujeitos a uma incisão cutânea e disseção muscular semelhante ao procedimento SNI), em sessões teste realizadas 11-20 dias e 31-41 dias após a indução da condição dolorosa. Adicionalmente, foi verificado que os défices da WM produzidos pela indução da lesão do nervo ciático poderão estar associados com alterações da estrutura e função hipocampal, em particular nos mecanismos de LTP (Ren *et al.*, 2011). Recorrendo ao modelo de dor neuropática SNI, Cardoso-Cruz *et al.* (2013a) demonstraram a ocorrência de um comprometimento da performance de WM espacial, 3, 5, 7 e 10 dias após indução da lesão persistente, temporalmente relacionado com alterações nos padrões da atividade de disparo populacional do mPFC. Associados à queda da performance comportamental encontram-se a redução do número de ensaios realizados pelos animais SNI, bem como o aumento do tempo de alternância e navegação na *delay-zone* (área compreendida entre os locais de recompensa e o corredor central). Por outro lado, os resultados do estudo apontam para uma redução da comunicação mPFC-hipocampal que se deve, possivelmente, ao desenvolvimento de mecanismos adaptativos aquando da instauração da condição de dor, que podem perturbar os processos de memória dependentes da integridade da WM espacial (Saab, 2012). Utilizando o mesmo paradigma comportamental (*Figure-8 spatial alternation task*) mas um modelo animal de dor distinto (CFA), Cardoso-Cruz *et al.* (2013b) demonstraram que a indução de uma condição dolorosa crónica (neste caso inflamatória) compromete significativamente os níveis de performance de WM espacial, corroborando os estudos já mencionados neste modelo de dor (Cain *et al.*, 1997; Lindner *et al.*, 1999). Por outro lado, reportaram que, de uma forma semelhante ao verificado noutro estudo com o modelo de dor SNI no mesmo paradigma (Cardoso-Cruz *et al.*, 2013a), após a administração de CFA, os animais despendem mais tempo a navegar na *delay-zone* e iniciam menos ensaios do que os animais do grupo *sham* (Cardoso-Cruz *et al.*, 2013b). Os resultados deste estudo permitiram estabelecer um elo de ligação entre os défices cognitivos apresentados e a redução global da conectividade do circuito mPFC-tálamo médiodorsal, indicando que menos informação é processada por este circuito durante a execução do paradigma de *delayed alternation*. Por fim, num estudo que versou sobre o papel dos

recetores e da sinalização dopaminérgica no eixo dorso-ventral da área CA1, Cardoso-Cruz *et al.* (2014) voltaram a demonstrar a ocorrência da redução dos níveis de performance de animais SNI no paradigma *Figure-8 spatial alternation task*, particularmente nas sessões de teste iniciais. Adicionalmente, os resultados demonstraram que a ativação dos recetores dopaminérgicos D2/D3 pela administração sistémica de um agonista seletivo (quimpírol) é capaz de restaurar a performance cognitiva comprometida para níveis idênticos ao grupo controlo.

Falta, no entanto, compreender de que forma a dor crónica pode contribuir para uma degradação da estabilidade dos circuitos do PFC de suporte à codificação de WM. Este passo terá um potencial translacional de grande importância para o desenho de novas estratégias terapêuticas que procurem restituir a atividade do PFC e reverter os défices de *working memory* associados à persistência de síndromes dolorosas.

2.4 - O papel da modulação dopaminérgica na atividade do córtex pré-frontal e nos défices de *working memory*

Estudos recentes mostraram o papel da dopamina (DA) na neuromodulação da atividade do PFC no suporte de diversas funções cognitivas (Floresco, 2013). Nesta estrutura, a ação da DA resulta da dinâmica da interação de uma componente intrínseca, na qual a libertação de DA é gerada pela atividade glutamatérgica nos terminais dopaminérgicos – ação tónica; e de uma componente extrínseca, através da atividade dos neurónios dopaminérgicos da área tegmental ventral, que libertam DA de forma fásica em períodos chave durante a performance comportamental, e que funcionam como reforço da aprendizagem (Dreher *et al.*, 2002). Ambas as classes de recetores dopaminérgicos, D1 e D2-like, podem ser encontradas em neurónios piramidais e em interneurónios GABAérgicos do PFC (Vincent *et al.*, 1993; Benes *et al.*, 2001), verificando-se uma maior prevalência dos recetores D1-like quando comparado com os restantes subtipos de recetores dopaminérgicos (Lidow *et al.*, 1991; Gaspar *et al.*, 1995). Como tal, a DA pode exercer efeitos diretos e indiretos na excitabilidade dos neurónios piramidais do PFC (Gorelova *et al.*, 2002; Gao *et al.*, 2003).

A deficiente sinalização dopaminérgica no PFC está correlacionada com a manifestação de défices cognitivos, nos quais a WM está incluída (Lewis *et al.*, 2006). Níveis hipodopaminérgicos são responsáveis por um aumento da atividade do PFC e do número de erros em tarefas de WM (Cools *et al.*, 2002; Tseng *et al.*, 2007). Os resultados de vários estudos de manipulação farmacológica da transmissão dopaminérgica sugerem que os recetores D1-like (Sawaguchi *et al.*, 1991; Cai, 1997; Seamans *et al.*, 1998; Henze *et al.*, 2000; Amico *et al.*, 2007) e D2-like (Druzin *et al.*, 2000; Karl *et al.*, 2006) do PFC

influenciam a precisão em várias tarefas de WM. No âmbito destes estudos, demonstrou-se que a modulação da WM pelos recetores D1 do PFC assume a forma de uma curva em “U”-invertido (Arnsten, 1997), sendo que a ativação reduzida ou excessiva destes recetores está associada a perturbações desta função cognitiva.

Os estudos de Sawaguchi *et al.* (1991, 1994), realizados em primatas, foram pioneiros no que respeita à demonstração de défices cognitivos associados à manipulação farmacológica de recetores dopaminérgicos pré-frontais. Nestes estudos, os animais foram testados numa tarefa *delayed response* oculomotora, após administração intracerebral de antagonistas de recetores D1 ou D2. Verificou-se que a administração de antagonistas D1, ao contrário da injeção de antagonistas D2 ou controlo salino, produz défices na performance comportamental. O mesmo efeito comportamental foi observado em roedores por Zahrt *et al.* (1997), que demonstraram que a supra-estimulação de recetores D1 resultante da infusão de um agonista com elevada afinidade para estes recetores (SKF 81297) na região PL do mPFC gera perturbações da performance comportamental durante a execução de uma tarefa de WM espacial (*T-maze*). Este estudo reforça o modelo da modulação da WM pelos recetores D1 em “U”-invertido (Arnsten, 1997; Dent *et al.*, 2012), uma vez que a estimulação insuficiente, bem com a estimulação supranormal destes recetores conduziu à redução da proporção de respostas corretas quando comparado com a condição controlo. Curiosamente, em situações em que a performance de WM já se encontra comprometida, o tratamento com as mesmas doses de agonista dos recetores D1 produz efeitos diametralmente opostos aos observados quando os níveis de performance são normais, contribuindo para a melhoria do desempenho da WM (Floresco *et al.*, 2001). Um outro estudo procurou estudar o efeito da modulação dopaminérgica da região PL do mPFC de roedores na performance comportamental numa tarefa de WM espacial (*8-arm radial maze*), após a injeção local de antagonistas dos recetores D1 ou D2 (Seamans *et al.*, 1998). Os resultados demonstraram que a microinjeção de um antagonista D1 produziu défices (dependentes da dose de antagonista administrada) na performance comportamental; porém, tal efeito não se verificou após a administração de um antagonista D2, o que apresenta concordância com os estudos pioneiros realizados em primatas (Sawaguchi *et al.*, 1991, 1994).

Apesar da função dos recetores D2-like na WM ser ainda pouco clara, alguns estudos têm demonstrado que estes recetores também desempenham um papel neste domínio cognitivo (Druzin *et al.*, 2000; Glickstein *et al.*, 2002; Tarantino *et al.*, 2011). O estudo de Glickstein *et al.* (2002) demonstrou que ratinhos deficientes em recetores dopaminérgicos D2 e D3 exibem défices na performance de uma tarefa de WM espacial. Druzin *et al.* (2000) investigaram os efeitos da modulação dos recetores D2 do PFC de

roedores nos componentes executivos da WM. Como tal, foi avaliada a performance de animais durante a execução do paradigma *delayed response* U-maze, após a administração local de um agonista ou antagonista dos recetores D2. A infusão bilateral do agonista dos recetores D2 na parede medial do PFC produziu um aumento da taxa de erro (dependente da dose de agonista) na execução comportamental, traduzindo-se num comprometimento da WM. Em contraste, a administração do antagonista destes recetores promoveu um aumento da precisão da performance, ou seja, na melhoria da WM. O mesmo estudo propôs que a modulação da WM através dos recetores D2 assume uma forma linear, dado que a níveis elevados de ativação destes recetores correspondem performances fracas e vice-versa. Desta forma, os recetores D2 do PFC podem também contribuir para a WM, mas por princípios distintos dos característicos dos recetores D1 (modulação em “U”-invertido) (Floresco, 2013).

2.5 - Papel da dopamina na modulação dos sinais nocicetivos

A degradação da transmissão dopaminérgica foi observada no PFC e em outras áreas do cérebro durante a persistência de síndromes dolorosas (Pais-Vieira *et al.*, 2009). Também importante é o papel que a DA desempenha na modulação da experiência da dor, através do aumento ou diminuição da propagação dos sinais nocicetivos que, indiretamente, podem influenciar a performance nos processos cognitivos associados ao PFC (Wood, 2008). O efeito antinocicetivo da DA deve-se, em grande parte, à dinâmica de ativação dos recetores D2-like, tendo sido demonstrado que microinjeções de agonistas destes recetores no córtex orbital ventrolateral de ratos produzem reduções (dependentes da dose) na dor aguda e na resposta alodínica a estímulos mecânicos induzidos pelo modelo SNI, efeitos que são eliminados pelo raclopride, antagonista dos recetores D2-like (Dang *et al.*, 2010). Outros estudos reportaram que a dor neuropática gerada pela desnervação do nervo ciático é atenuada por injeções locais nos córtices cingulado (Lopez-Avila *et al.*, 2004) e insular anterior (Coffeen *et al.*, 2008) de um agonista de recetores D2-like, mas não por um agonista dos recetores D1-like. A lesão bilateral da área tegmental ventral (fonte de inervação dopaminérgica para diversas áreas cerebrais, entre elas o PFC) agrava os padrões comportamentais associados à dor (Sotres-Bayon *et al.*, 2001). Por outro lado, o mesmo estudo demonstrou que a estimulação da mesma estrutura está associada com o desenvolvimento de analgesia (Sotres-Bayon *et al.*, 2001). De um modo geral, os resultados destes estudos sugerem que a ativação de recetores dopaminérgicos, particularmente dos recetores D2-like, contribui para o processo de antinociceção e que a sua modulação constitui uma importante componente da percepção da dor.

3 - Modulação da atividade do córtex pré-frontal medial

O controlo seletivo da atividade do PFC constitui um relevante desafio, dada a diversidade das populações de neurónios pré-frontais, aliada à complexidade da rede de neurotransmissores. A dificuldade em controlar apenas um tipo celular no cérebro, mantendo os restantes neurónios inalterados, foi reportada por Francis Crick em finais dos anos 70 (Crick, 1979). Tendo em conta que os fármacos utilizados exibiam baixa precisão temporal na escala temporal da codificação e sinalização neuronal, e que os elétrodos não apresentavam a especificidade para o tipo celular pretendido, Crick especulou que a luz poderia ter propriedades que a tornam passível de servir como uma ferramenta de controlo neuronal. Um estudo, que data de 2005, descreve que neurónios se tornam capazes de responder com elevada precisão a estímulos luminosos, após introdução de um gene de uma opsina microbiana, *channelrhodopsin-2* (ChR2), sem outros componentes ou químicos (Boyden *et al.*, 2005). Assim surgiu o campo da Optogenética. Desde então, vários estudos têm vindo a demonstrar que, tal como a ChR2, outras opsinas exibem a capacidade de ativar ou inibir neurónios específicos em sistemas biológicos complexos, de forma rápida, específica e segura, em resposta a diferentes comprimentos de onda do espectro de luz visível (Deisseroth, 2011). Tais características, aliadas ao facto de estas ferramentas optogenéticas serem capazes de funcionar em escalas temporais comensuráveis com taxas fisiológicas de disparo neuronal e em momentos chave de testes comportamentais (Deisseroth, 2011), tornam esta técnica numa vantajosa metodologia a utilizar para o estudo do PFC e para o controlo seletivo da sua atividade neuronal.

Os genes de opsinas codificam proteínas compostas por 7 domínios transmembranares e podem ser divididos em duas famílias distintas: genes de opsinas microbianas (tipo I), presentes em seres procariotas, algas e fungos (Spudich, 2006), ou genes de opsinas animais (tipo II), encontrados apenas em seres eucariotas superiores (Sakmar, 2002; Shichida *et al.*, 2003). As opsinas de ambas as famílias necessitam de retinal (cofator orgânico derivado da vitamina A), que age como um captador de fotões. Quando ocorre a ligação do retinal à opsina, através de uma ligação covalente a um resíduo conservado de lisina da hélice 7, formando uma base de *Schiff* protonada, a proteína funcional passa a adotar o termo rodopsina (Fenno *et al.*, 2011).

O leque de ferramentas optogenéticas tem sofrido uma vasta expansão, englobando, atualmente, dezenas de sistemas ativados por vários comprimentos de onda na região de luz visível. As opsinas *channelrhodopsin-1* (ChR1) e *channelrhodopsin-2*

(ChR2), inicialmente descobertas em algas verdes da espécie *Chlamydomonas reinhardtii*, são canais catiónicos não específicos que absorvem luz azul de comprimento de onda de 480 nm que, tal como outras opsinas microbianas, necessitam de retinal como cofator sensível à luz para o seu bom funcionamento (Nagel *et al.*, 2002; Nagel *et al.*, 2003). O influxo de catiões, como H^+ , Na^+ , K^+ e Ca^{2+} , induzido por estimulação luminosa, pode ser utilizado para despolarizar a membrana neuronal e modular positivamente o disparo de potenciais de ação em alvos específicos (Figura 1) (Nagel *et al.*, 2003; Bamann *et al.*, 2008).

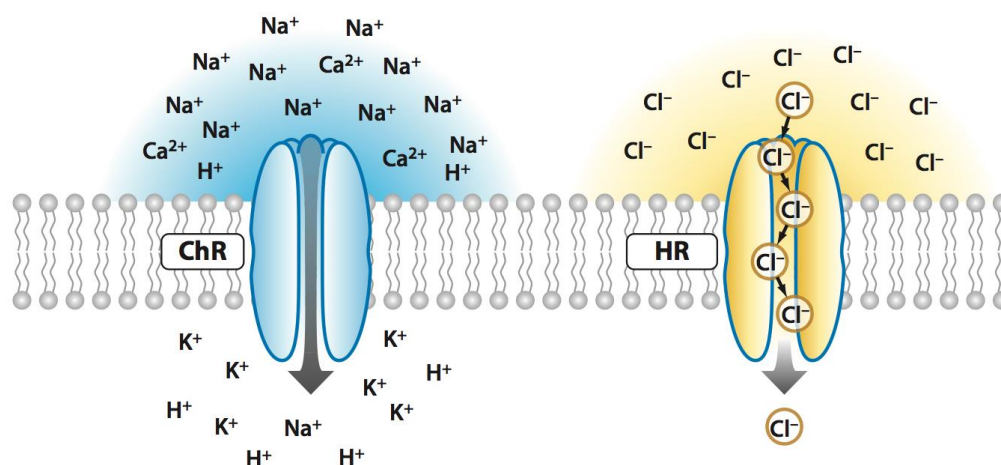


Figura 1 – Channelrhodopsin (ChR) e halorhodopsin (HR). As *channelrhodopsin* conduzem catiões e promovem uma despolarização do neurónio após estimulação com luz azul (esquerda). As *halorhodopsin* conduzem aniões cloreto do meio extracelular para o interior do neurónio, após estimulação com luz amarela, promovendo uma hiperpolarização da membrana (direita). Adaptado de Fenno *et al.* (2011).

A primeira opsina microbiana a evidenciar-se como uma ferramenta para a inibição da atividade neuronal foi a *halorhodopsin* (NpHR), uma bomba de aniões Cl^- sensível à luz, naturalmente expressa pela halobactéria *Natronomonas pharaonis* (Schobert *et al.*, 1982; Bamberg *et al.*, 1993). A NpHR bombeia ativamente iões Cl^- para o interior celular em resposta a luz amarela, com um pico de absorção com comprimento de onda de 570 nm (Figura 1).

O método de eleição para a disponibilização de genes no sistema nervoso consiste em infetar células com um vírus cuja capacidade de replicação está comprometida, geralmente um lentivírus ou um *adeno-associated* vírus (AAV), que contém o transgene de interesse sob controlo de um curto promotor ou de um elemento *enhancer* (Luo *et al.*, 2008). A utilização de sistemas de expressão viral apresenta, como principais vantagens, a rápida e versátil implementação, bem como níveis robustos de expressão, que resultam da eficaz capacidade de infeção e elevado número de cópias (Fenno *et al.*, 2011). A especificidade celular pode ser obtida pela utilização de

promotores específicos, pela localização espacial da injeção viral e pela restrição da ativação de opsinas a células (ou projeções celulares) específicas através da transmissão direcionada de luz (Zhang *et al.*, 2010). Tanto os lentivírus, como os AAV, têm sido utilizados para introduzir genes de opsinas em cérebros de ratinhos, ratos e primatas, sendo, normalmente, bem tolerados e altamente expressos por longos períodos de tempo, sem efeitos adversos reportados (Zhang *et al.*, 2010).

A elevada especificidade da optogenética depende, fundamentalmente, de tecnologias de transmissão direcionada de luz, tanto em sistemas *in vitro* como *in vivo*. Em estudos realizados *in vivo*, a estimulação ótica é mais desafiante, uma vez que é necessário proceder-se à introdução estereotáxica de implantes cirúrgicos numa região adjacente ao local alvo, tendo, necessariamente, que haver penetração do crânio. A luz deve ser disponibilizada a locais muito próximos do alvo pretendido, uma vez que o tecido cerebral difrata, exponencialmente, a luz, verificando-se a incidência de apenas 10 % da intensidade luminosa a uma distância aproximada de 500 µm da fonte luminosa (Aravanis *et al.*, 2007). Atualmente, o método mais comum para o fornecimento do estímulo luminoso *in vivo* consiste na implantação de um curto segmento de fibra ótica na região alvo, sendo que a este segmento pode ser acoplada uma fibra ótica de maiores dimensões (ligada na extremidade oposta a um díodo laser ou LED) através de um adaptador específico fibra-fibra (Zhang *et al.*, 2010).

Apesar de ter sido demonstrado que as ferramentas optogenéticas permitem a ativação ou inibição precisa e eficaz de populações neuronais específicas, são escassos os estudos que analisaram os efeitos da manipulação optogenética da função do PFC, particularmente da população de neurónios piramidais. Atualmente, é possível controlar, seletivamente, neurónios piramidais do PFC, através da injeção local de opsinas recorrendo a vetores virais (*adeno-associated* vírus), cuja expressão é dirigida pelo promotor CaMKII (Nakamura *et al.*, 2012). Recentemente, reportou-se que a ativação optogenética das células excitatórias do mPFC de roedores produz uma inibição do comportamento social exploratório não condicionado e do condicionamento do medo (Yizhar *et al.*, 2011), e que esta ativação gera efeitos do tipo antidepressivo (Covington *et al.*, 2010). Adicionalmente, foi demonstrado que a ativação de interneurónios GABAérgicos do mPFC compromete a performance em paradigmas *delayed alternation* (Rossi *et al.*, 2012) e facilita a extinção do comportamento de busca de recompensa (Sparta *et al.*, 2014). Por outro lado, a estimulação optogenética excitatória destes interneurónios é capaz de reverter os défices de comportamento social provocados por uma excitação anormal do mPFC (Yizhar *et al.*, 2011).

Tendo em conta o elevado potencial desta técnica, encontra-se facilitado o estudo dos efeitos da estimulação optogenética de determinadas populações neuronais do PFC e das possíveis consequências cognitivas que daí advêm.

4 – Objetivos do trabalho

Este trabalho visa clarificar o papel do controlo seletivo de neurónios piramidais do córtex pré-frontal medial do rato no processo de WM. Adicionalmente, propõe-se a explorar o efeito da modulação dos recetores de dopamina D2, com o objetivo de restaurar a normal atividade pré-frontal e reverter os défices de *working-memory* verificados em situações de dor persistente.

Especificamente, o plano de trabalhos pretende responder às seguintes questões:

- 1 – Como é que a modulação optogenética da atividade de neurónios piramidais pré-frontais pode contribuir para a manifestação de alterações na performance de *working memory*?
- 2 – De que forma é que a modulação farmacológica sistémica de recetores de dopamina D2 pode ter um efeito pró-cognitivo nos circuitos pré-frontais de *working memory* num modelo animal de dor neuropática?

METODOLOGIA

1 - Modelo animal

Para modelo animal foram utilizados ratos machos albinos da estirpe *Sprague-Dawley* (Charles River, Barcelona, Espanha) com peso compreendido entre 275 e 350 g. Os animais foram mantidos num ciclo de 12 horas diurno/noturno, a uma temperatura constante de 21 ± 2 °C e humidade relativa entre 50 e 70 %. As sessões de habituação dos animais decorreram diariamente à mesma hora durante o período diurno. Durante o decorrer das experiências, os ratos foram mantidos em regime de restrição alimentar para 90-95 % do seu peso corporal em consumo *ad libitum*. Todos os procedimentos experimentais foram conduzidos de acordo com as linhas éticas para experimentação animal impostas pela diretiva da Comunidade Europeia (2010/63/CE) e pelas diretrizes éticas para experimentação de dor em modelos animais (Zimmermann, 1983).

2 - Paradigma comportamental e plano de treinos

Neste trabalho, a performance de WM espacial foi avaliada recorrendo a um paradigma comportamental *2-lever non-match choice (delayed non-matching to sample)* com período de espera variável. A arena, de dimensões 45 x 45 cm, apresentava paredes opacas com 40 cm de altura. Os animais foram colocados na arena que continha um painel com duas alavancas operantes retráteis, posicionadas a 3 cm da base e espaçadas entre si por 30 cm (Figura 2). Entre as alavancas encontrava-se uma calha de alimentação, através da qual eram fornecidos *pellets* de reforço. No painel localizado no lado oposto da arena, estava localizada uma alavanca operante retrátil (alavanca de início) que, quando ativada, ditava o princípio da tarefa comportamental.

Os ratos foram treinados a pressionar a alavanca de início, começando o *forced trial*. Neste ensaio, uma das duas alavancas do painel oposto era exposta e o animal teria que se aproximar da mesma e pressioná-la, iniciando um período de espera. Findado este período, tomava início o *free-choice trial*, onde ambas as alavancas eram expostas e o animal teria que se aproximar da alavanca contrária à premida no *forced trial* e pressioná-la. Após pressionar a alavanca correta, era fornecido um *pellet* de reforço, através da calha de alimentação, e exposta a alavanca de início (Figura 2). Nas situações em que a alavanca premida no *free-choice trial* correspondia à pressionada no *forced trial*, não era fornecido qualquer *pellet* de reforço. O controlo das alavancas, bem como do dispensador de *pellets* foi realizado de forma automática, com recurso ao *software OpenControl* adaptado para esta tarefa (Aguiar *et al.*, 2007). A sala de teste encontrava-se moderadamente iluminada e rica em pistas visuais, distantes da arena de treino.

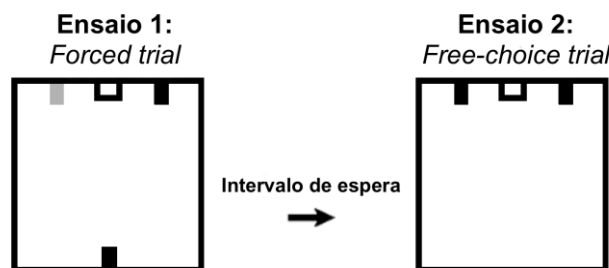


Figura 2 - Diagrama do paradigma 2-lever non-match choice comportamental utilizado no presente estudo e da respetiva sequência lógica de resolução.

Os animais foram sujeitos a um período de treino de 10 dias, durante o qual realizaram três sessões diárias de 10 minutos para permitir a aprendizagem do paradigma em questão. Cada sessão diária era composta por 20 pares de ensaios, formados por um *forced* e um *free-choice*, com a duração de 20 e 30 segundos, respetivamente. Terminada a curva de aprendizagem, apenas os animais cuja performance igualou ou superou 80 % de sucesso foram selecionados para prosseguir o protocolo de gravação neuronal e estimulação optogenética.

3 - Implantação cirúrgica de matrizes de microelétrodos intracranianos e de um implante de fibra ótica

Os animais selecionados (n total = 16) foram anestesiados com uma injeção intraperitoneal (IP) combinada de medetomidina (0,5 mg/kg) e cetamina (75 mg/kg). O grau de anestesia foi mantido com injeções IP de 1/3 da dose inicial de cetamina e foi avaliado periodicamente, testando o piscar da córnea, bem como os reflexos das patas posteriores, por aplicação de pressão com auxílio de uma pinça cirúrgica. A temperatura corporal dos animais foi mantida a 37 °C através da utilização de uma manta homeotérmica. De forma a evitar efeitos resultantes de desidratação, a superfície ocular foi revestida com óleo oftálmico e procedeu-se à injeção subcutânea de solução salina (NaCl 0,9% p/v). Posteriormente, procedeu-se à remoção do pelo na região da incisão cirúrgica, seguida de esterilização da pele através da aplicação de etanol 70 % (v/v) e betadine. Os animais anestesiados foram colocados num aparelho de estereotaxia (Kopf Instruments, Tujunga, CA, USA) e fixados com o auxílio de barras auriculares e suportes nasal e bucal. Foi realizada uma incisão de 2 cm, rostro-caudal (RC) relativamente aos olhos, seguida da separação do tecido conjuntivo subjacente, expondo o crânio. Após limpeza da superfície cranial, identificaram-se os pontos *bregma* e *lambda*. Ambos foram alinhados para a mesma coordenada dorso-ventral (DV), ajustando a altura do suporte nasal do sistema estereotáxico até que a cabeça do animal adotasse um plano

totalmente horizontal. As etapas subsequentes do processo cirúrgico apresentam diferenças mediante a finalidade das experiências a que os animais estão destinados.

Tarefa 1 - Modulação optogenética da atividade pré-frontal na execução de uma tarefa de *working memory*

Nos animais designados para experiências de modulação optogenética e registo eletrofisiológico do mPFC ($n = 4$), realizou-se uma pequena craniotomia unilateral para futura microinjeção viral e colocação de uma estrutura de suporte a uma matriz de microelétrodos intracranianos e a uma fibra ótica. Após remoção da membrana da *dura mater*, procedeu-se à montagem de uma microseringa Hamilton de 1 μ L (calibre 25s) num suporte estereotáxico que foi lentamente introduzida no cérebro, até à região pretendida. As coordenadas de microinjeção e implantação utilizaram como referência o atlas do cérebro do rato de Paxinos (Paxinos *et al.*, 1998). Para a microinjeção dos vetores virais rAAV5/CaMKIIa-eNpHR3.0-eYFP ($6,0 \times 10^{12}$ vg/mL) e rAAV5/CaMKIIa-hChR2(H134R)-mCherry ($5,9 \times 10^{12}$ vg/mL) (Vector Core, UNC, USA), foram utilizadas as seguintes coordenadas estereotáxicas relativas ao *bregma* para centrar a agulha da seringa na região de injeção (mPFC): +2,7 mm RC; -0,7 mm medio-lateral (ML); -3,2 mm DV. Após posicionamento da seringa na região pretendida, procedeu-se à microinjeção de 1 μ L de suspensão de vetores virais (0,5 μ L rAAV5/CaMKIIa-hChR2(H134R)-mCherry + 0,5 μ L rAAV5/CaMKIIa-eNpHR3.0-eYFP) a uma taxa de 0,1 μ L/min. Terminada a microinjeção, a seringa permaneceu na mesma posição por cerca de 10 minutos, de forma a permitir a difusão do vetor viral pelo tecido cerebral. De seguida, retirou-se lentamente a seringa. Previamente à colocação da estrutura de suporte, foram realizados orifícios no crânio, para a colocação de 4 microparafusos. Estes foram utilizados para sustentação do futuro implante e como referência externa dos microelétrodos. As estruturas suportaram matrizes de oito filamentos (arquitetura em 4x2 com espaçamento de 250 μ m entre filamentos e 450 μ m entre linhas) de tungsténio (35 μ m de diâmetro) com isolamento de uma resina – isonel, e com impedâncias variando entre 0,5 e 0,7 M Ω a 1 kHz. Adicionalmente, suportaram um implante de fibra ótica (PlexBright Fiber Stub Implant, Plexon Inc, Dallas, TX, USA) com as seguintes características: 8 mm de comprimento de fibra ótica exposta, interface de suporte num cerâmico de zircónia com 6,45 mm de comprimento, 200 μ m de diâmetro do núcleo da fibra e 230 μ m de diâmetro total da fibra, incluindo o revestimento. A estrutura foi orientada rostro-caudalmente e montada num suporte estereotáxico. De seguida, foi lentamente introduzida no cérebro até à região desejada. Para tal, foram utilizadas as seguintes coordenadas estereotáxicas relativas ao *bregma*: +2,7 mm RC; -0,7 mm ML; -3,2 mm DV. Após colocação da estrutura, procedeu-se à selagem da craniotomia, recorrendo a cimento dental acrílico.

Tarefa 2 - Estudo do efeito da modulação dos recetores de dopamina D2 na performance de *working memory* num modelo animal de dor neuropática

Relativamente aos animais destinados a experiências de modulação dos recetores de dopamina D2 (n total = 12), realizou-se uma pequena craniotomia unilateral para futura colocação de uma estrutura de suporte a uma matriz de microelétrodo intracranianos. Previamente à colocação da estrutura de suporte, foram realizados orifícios no crânio, para a colocação de 4 microparafusos, utilizados para a sustentação do implante e como referência externa dos microelétrodo. A estrutura foi orientada rostro-caudalmente e montada num suporte estereotáxico. Após remoção da membrana da *dura mater*, introduziu-se lentamente a estrutura no cérebro até ao mPFC (+2,7 mm RC; -0,7 mm ML; -3,2 mm DV). Após colocação da estrutura, procedeu-se à selagem da craniotomia, recorrendo a cimento dental acrílico. Terminada a implantação da estrutura, procedeu-se à indução cirúrgica do modelo de dor SNI ou a uma intervenção cirúrgica controlo (*sham*).

No final de ambas as variantes do processo cirúrgico, administrou-se subcutaneamente o anti-inflamatório não esteroide carprofeno (7,5 mg / kg; Rimadyl, Pfizer Animal Health, Lisboa, Portugal). Terminado o procedimento cirúrgico, os animais intervencionados foram transferidos para uma caixa limpa e esterilizada, onde permaneceram a recuperar.

4 - Indução do modelo de dor neuropática – *Spared-nerve injury*

Na mesma intervenção (etapa 2) e imediatamente após a implantação da matriz de microelétrodo, procedeu-se à indução do modelo animal de dor neuropática – *Spared-Nerve Injury* (SNI) (Decosterd *et al.*, 2000). Os animais (grupo SNI, $n = 4$) foram anestesiados com uma injeção intraperitoneal combinada de medetomidina (0,5 mg/kg) e cetamina (75 mg/kg). De seguida, foi realizada uma incisão cutânea da superfície lateral da coxa contralateral ao local de implantação da matriz de microelétrodo e fibra ótica. Posteriormente, foi realizado o seccionamento do músculo bicípite femoral, expondo o nervo ciático e os respetivos terminais distais dos seus ramos: sural, peroneal comum e tibial. Os nervos peroneal comum e tibial foram ligados com linha de sutura cirúrgica não absorvível, mantendo o nervo sural intacto. As porções distais à ligação efetuada foram seccionadas, tendo sido removido 2 a 4 mm da cápsula distal do nervo. Durante todo o

procedimento, foram tomadas as devidas precauções para evitar qualquer contacto ou estiramento do nervo sural, garantindo a sua integridade.

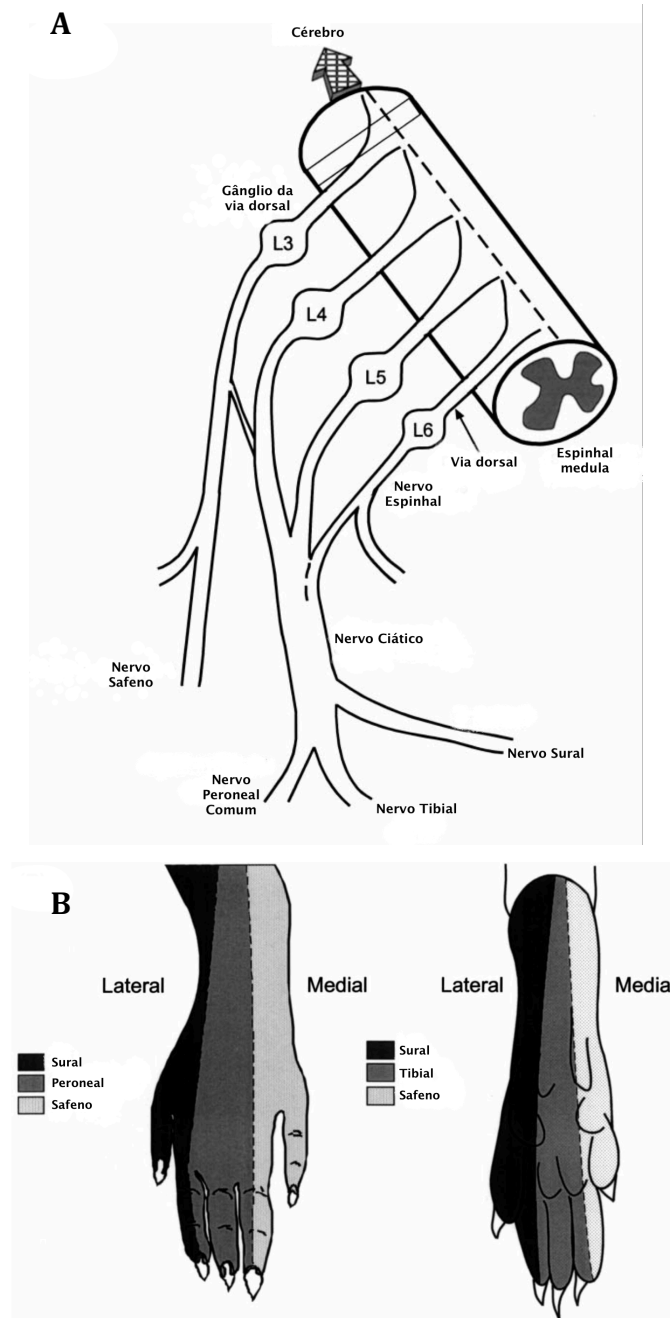


Figura 3 – O nervo ciático em roedores: ramos terminais e respetivas enervações da pata posterior. (A) Esquema representativo dos nervos ciático e safeno e respetivos ramos terminais e origens na via dorsal. **(B)** Áreas da região dorsal e plantar da pata do rato enervadas pelos ramos terminais do nervo ciático e nervo safeno. Adaptado de Decosterd *et al.* (2000).

Para além do grupo SNI, foi também formado um grupo *sham* ($n = 4$), cujos animais constituintes foram submetidos a uma intervenção cirúrgica que envolveu a mesma extensão de incisão cutânea e muscular do procedimento SNI. No final do

procedimento cirúrgico, o músculo e a pele foram suturados em duas camadas. Após a cirurgia, os animais permaneceram em recuperação por 23 dias.

No final das sessões de registo eletrofisiológico dos dias 22 (grupo controlo) e 38 (grupos *sham* e SNI), foram avaliados os níveis de dor através de uma série ascendente de monofilamentos de von Frey. A avaliação foi realizada no final das sessões de registo para impedir que o *stress* induzido pelos estímulos mecânicos gerados pelos monofilamentos influenciasse o comportamento do animal no decorrer das experiências. Durante essa avaliação, os animais foram colocados numa plataforma elevada com piso composto por uma rede metálica, possibilitando a estimulação mecânica. Foi avaliada a resposta ao estímulo exercido na superfície plantar medial e lateral da pata do rato subjacente à implementação do modelo de dor. A série de monofilamentos foi percorrida desde o mais fino até ao mais espesso para detetar o filamento que evoca a retração da pata em, pelo menos, seis de 10 aplicações sucessivas. Após a primeira série, foram realizadas duas séries adicionais de 10 estimulações (com intervalo de dois minutos entre sessões) usando o mesmo monofilamento e calculado o número médio de respostas positivas invocadas pelas três séries.

5 - Protocolos experimentais

Tarefa 1 - Estimulação optogenética do mPFC

Após um período de repouso de 15 dias, procedeu-se ao retreino dos animais intervencionados por um período de cinco dias. As experiências de estimulação optogenética (Figura 4) foram realizadas em simultâneo com a execução do paradigma comportamental e com registos eletrofisiológicos. Cada animal foi testado na tarefa de WM com dois tempos de espera entre-ensaios (3 e 6 segundos), com duas sessões por cada condição experimental. Foram realizados três grupos de estimulações: sessões de controlo (sem estimulação), sessões com estimulação optogenética inibitória e excitatória.

No período prévio às sessões teste, os animais foram levemente anestesiados com isoflurano para facilitar a conexão de um transmissor *wireless* (Headstage - W16, Triangle Biosystems, Durham, NC, USA) e de um cabo de fibra ótica (com 1 metro de comprimento, 200 μm de diâmetro do núcleo da fibra e 230 μm de diâmetro total da fibra, incluindo o invólucro). Os cabos de fibra ótica foram depois conectados a um comutador que possibilita o movimento livre dos animais durante a performance comportamental. Esse comutador suporta duas fontes luminosas LED (PlexBright Compact LED Module, Plexon Inc, Dallas, TX, USA). As fontes geraram pulsos luminosos a comprimentos de onda distintos: 470 nm para ativação da opsina excitatória e 590 nm para ativação da

opsina inibitória. Os pulsos TTL que despoletaram o pulso luminoso foram gerados através de uma interface USB-TTL (Pulser, Prizmatix, Israel), controlada com recurso a *software* personalizado (Pulser Windows, Prizmatix, Israel). As estimulações optogenéticas excitatória (intensidade de 5 mW, pulso de 15 ms, a 10 Hz, 3 s de duração total) ou inibitória (intensidade de 5 mW, pulso contínuo com 3 s de duração total) foram realizadas durante os primeiros 3 segundos do período de espera entre-ensaios do paradigma comportamental.

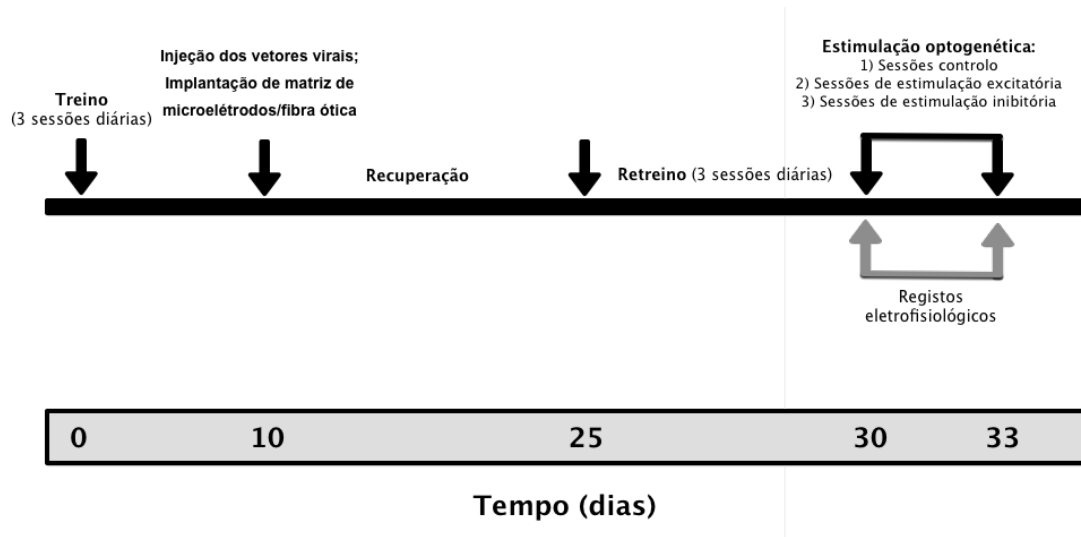


Figura 4 – Cronograma experimental das experiências de estimulação optogenética (Tarefa 1).

Tarefa 2 - Modulação dos recetores de dopamina D2

Após sete dias de recuperação do procedimento de implantação da matriz de microelétrodos, os animais (grupo controlo, $n = 4$) foram retreinados (três sessões diárias) durante cinco dias, de forma a recuperar o nível de performance pré-cirúrgico. Atingido este nível, iniciou-se o protocolo de registo da atividade neuronal do mPFC dos animais implantados (Figura 5). Cada animal realizou duas sessões de registo eletrofisiológico por cada intervalo de espera (3 ou 6 segundos), espaçadas por uma hora, após administração sistémica de solução salina (realizada 20 minutos antes do início da sessão de registo).

Terminado o período de 23 dias de recuperação da cirurgia SNI ou *sham*, procedeu-se, por cinco dias, ao retreino dos animais intervencionados, de modo a estabilizar a performance comportamental. O protocolo de registo da atividade neuronal do mPFC de ambos os grupos experimentais teve início ao dia 38 e compreendeu, para cada animal e intervalo de espera entre-ensaios (3 e 6 segundos), duas sessões de registo após administração sistémica de raclopride (0,025 mg/kg em solução salina), antagonista seletivo dos recetores DA D2 (Figura 5). Os pares de sessões de registo

foram realizados em dias distintos. As sessões foram executadas após 20 minutos da administração sistémica de raclopride e espaçadas temporalmente por uma hora.

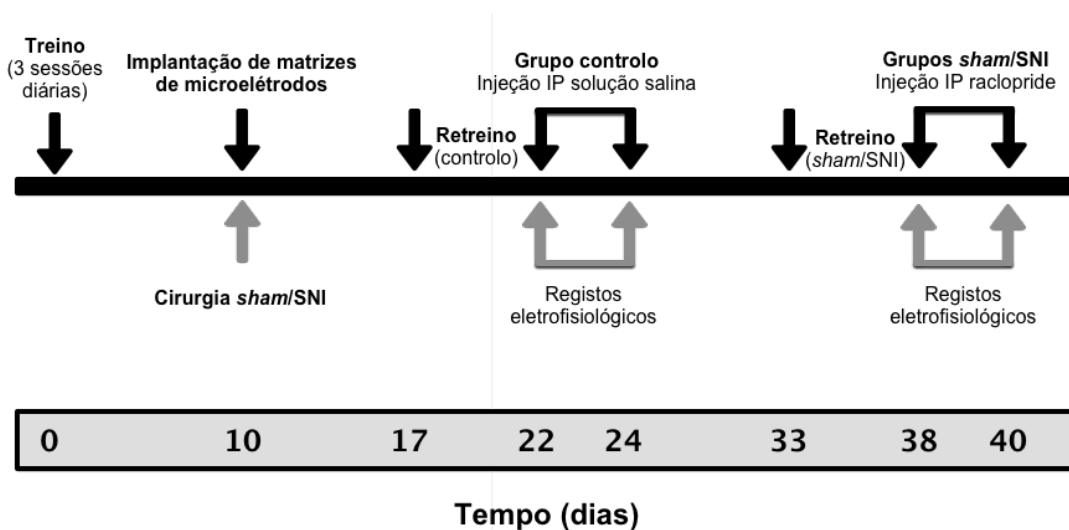


Figura 5 – Cronograma experimental das experiências de modulação dos recetores de dopamina D2 (Tarefa 2).

6 - Registos eletrofisiológicos

A atividade neuronal registada através dos microelétrodos implantados foi processada utilizando o sistema *Multineuron Acquisition Processor* (16-MAP, Plexon Inc, Dallas, TX, USA). Através de cada elétrodo foram registados, em paralelo, potenciais de ação de neurónios. Os potenciais de ação foram pré-amplificados entre 10000-25000X e digitalizados a 40 KHz. Foram utilizadas janelas de voltagem em função de tempo para a identificação das curvas dos potenciais de ação de cada neurónio. Através de cada canal foram registados 1-2 potenciais de ação diferentes, a sua seleção foi feita em *online* (SortClient 2002, Plexon Inc., Dallas, TX, USA) e validada por análise em *offline* (Offline Sorter 2.8., Plexon Inc., Dallas, TX, USA). O comportamento animal foi registado em vídeo utilizando o sistema *CinePlex* (Plexon Inc., Dallas, TX, USA), que possibilita a sincronização da atividade neuronal com a performance comportamental.

7 - Histologia

Terminadas todas as experiências, procedeu-se à indução profunda de anestesia dos animais com uma injeção IP de pentobarbital de sódio (200 mg/kg). De seguida, realizou-se a perfusão dos animais com tampão fosfato (0,01 M, pH = 7,2, em solução salina 0,9%), seguido de uma solução de paraformaldeído a 4%. Posteriormente, removeu-se o cérebro, que foi transferido para uma solução de PFA a 4% (p/v), onde permaneceu em fixação por 4 horas. Terminado o período de fixação, o cérebro foi colocado numa solução de sacarose a 30% (p/v), para de seguida se proceder ao

respetivo congelamento e seccionamento em cortes de 40 μm . Para a validação da expressão viral, os cortes foram lavados em PBS 0,1 M, montados em lâminas revestidas com gelatina e tratados com meio de montagem adequado a microscopia de fluorescência (glicerol em tampão fosfato 0,1 M, 3:1). De forma a identificar o local de injeção viral, estimulação optogenética e registo eletrofisiológico, os cortes do cérebro foram montados em lâminas revestidas com gelatina e posteriormente corados com tionina (0,1 %) e observados por microscopia de campo claro.

8 - Análise de dados

Para a análise estatística foi testada a normalidade dos dados experimentais (teste Kolmogorov-Smirnov com correção Dallal-Wilkinson-Lilliefors). Em condições de normalidade, as comparações estatísticas entre grupos experimentais foram realizadas pela análise de variância (*one-way* ANOVA), complementada com um teste *post-hoc* Bonferroni (Prism 6.0; GraphPad, San Diego, CA, USA). O nível de significância foi estabelecido em 5 %. Os resultados estão apresentados sob a forma de média \pm erro padrão da média.

Atividade de disparo neuronal

Os dados foram processados e analisados em *offline* no programa *NeuroExplorer* (Versão 3, Plexon Inc, Dallas, TX, USA) e exportados para *MatLab* (MathWorks, Natick, Massachusetts, USA). A atividade populacional média dos neurónios do mPFC foi analisada para os ensaios corretos e incorretos, em ambas as tarefas definidas. Para a elaboração dos *rasters* coloridos de atividade neuronal foi aplicada a função *imagesc* do software *MatLab*, na qual foi aplicado um filtro Gaussiano (função *Fspecial*) com os parâmetros: sigma = 0,5, intervalo [3, 3]. Foi utilizado o teste Kolmogorov-Smirnov (KS) para determinar se os conjuntos de dados analisados (atividade neuronal) seguiam uma distribuição normal no intervalo temporal [-3 s, +6 s], correspondendo o tempo = 0 s ao momento em que a alavanca do *free-choice trial* foi pressionada (Prism 6.0, GraphPad, San Diego, CA, USA). Todas as sessões de registo selecionadas para as comparações tiveram, pelo menos, 5 % de ensaios incorretos.

RESULTADOS

Tarefa 1: Modulação optogenética da atividade pré-frontal na execução de uma tarefa de *working memory*

1.1 – Validação da expressão das opsinas ChR2 e NpHR em células piramidais do córtex pré-frontal medial

Com o objetivo de modular a atividade neuronal do mPFC, tomou-se como alvo a população de neurónios excitatórios piramidais. Para tal, foram injetados estereotaxicamente no mPFC dois vetores virais *adeno-associated* (AAV) serotipo 5, que codificam para duas proteínas de fusão distintas, ambas expressas sob o controlo do promotor CaMKII: a hChR2-*mCherry*, opsina excitatória associada ao fluorocromo *mCherry*, e a eNpHR3.0-eYFP, opsina inibitória associada ao fluorocromo eYFP. A injeção viral conduziu à expressão de ChR2 e NpHR nas regiões PL e IL do mPFC de roedores (Figura 6, B e C). Adicionalmente, observou-se a colocalização de ambas as proteínas de fusão em neurónios com morfologia idêntica à de neurónios piramidais, demonstrada pela marcação simultânea de ambos os fluorocromos (Figura 7).

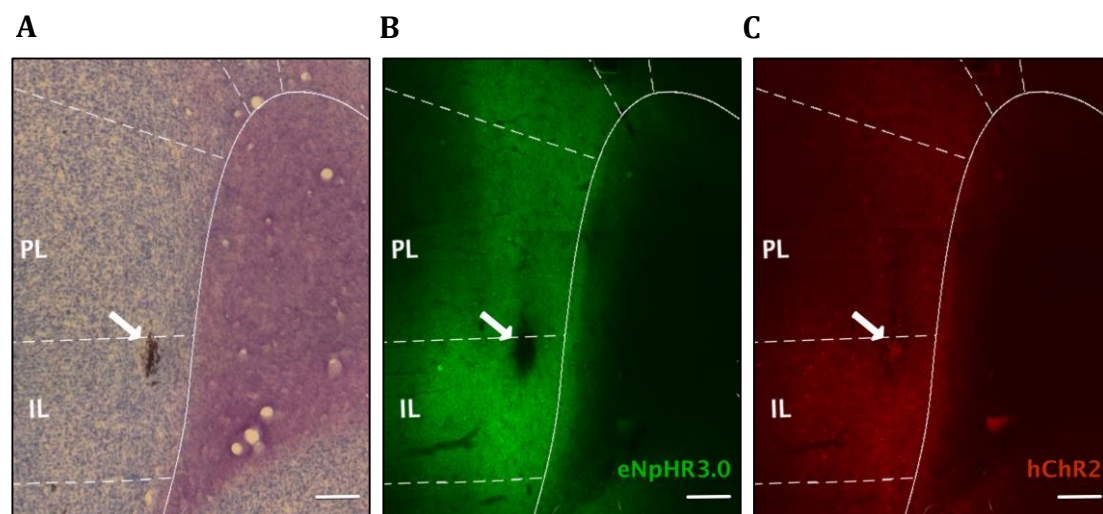


Figura 6 – Validação do local de injeção viral e da expressão das opsinas no mPFC por microscopia de campo claro e fluorescência. (A) Corte coronal ilustrando o local de injeção viral (seta) situado na fronteira entre as áreas pré-*limbica* (PL) e *infralimbica* (IL) do mPFC. (B-C) A marcação do fluorocromo eYFP (B) e *mCherry* (C) demonstra o sucesso da expressão das opsinas NpHR3.0 e ChR2, respetivamente, nas regiões pré-frontais indicadas. (A-C) As imagens correspondem a secções realizadas +2,7 mm rostro-caudal em relação ao ponto *bregma* (Paxinos et al., 1998). A escala corresponde a 200 μ m.

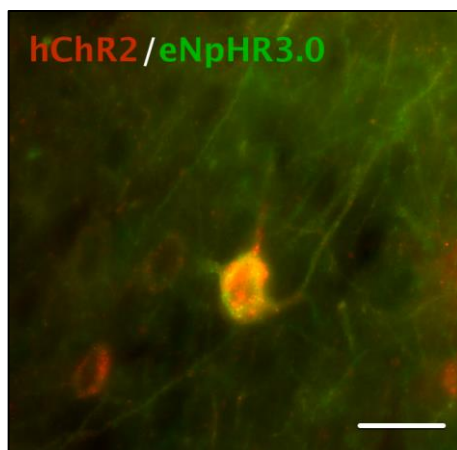


Figura 7 - Célula piramidal expressa as opsinas excitatória e inibitória. A célula central apresentada exhibe dupla marcação para os fluorocromos mCherry (pseudocoloração vermelha) e eYFP (pseudocoloração verde), indicando a colocalização das opsinas ChR2 e NpHR (demonstrada pela cor amarela, resultado da sobreposição das pseudocores de ambos os fluorocromos). A escala corresponde a 20 μ m.

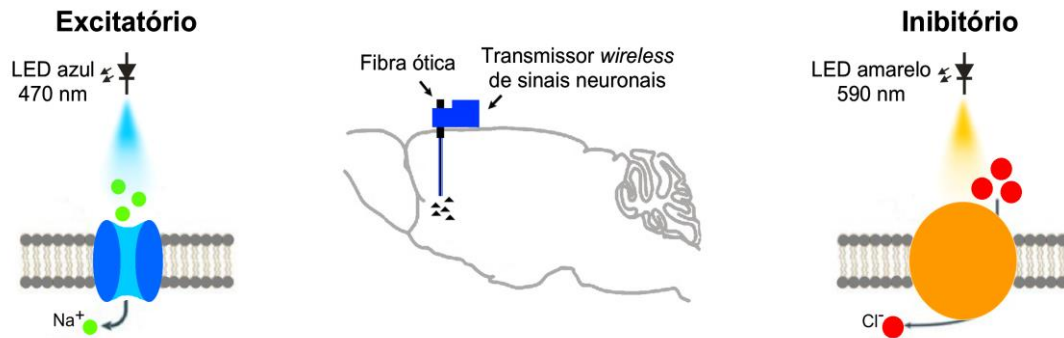
1.2 – Avaliação da atividade neuronal em resposta à estimulação optogenética

Após validação da expressão e colocalização das opsinas em neurónios piramidais do mPFC, realizaram-se estudos eletrofisiológicos que visaram testar a funcionalidade dos neurónios transduzidos com as opsinas e investigar qual a resposta destes neurónios face a estímulos optogenéticos excitatórios e inibitórios. Para tal, recorreu-se a uma matriz combinada de microelétrodos com uma fibra ótica, previamente implantada no mPFC, que possibilitou a disponibilização localizada de luz, acompanhada em simultâneo pelo registo eletrofisiológico da população neuronal nas imediações dos microelétrodos (Figura 8, A). Os estímulos optogenéticos excitatórios, que promovem a despolarização da membrana neuronal graças ao favorecimento da entrada de Na^+ para o meio intracelular (Figura 8, A, esquerda), foram gerados durante 3 segundos a uma intensidade de 5 mW, em pulsos de 15 ms e a uma frequência de 10 Hz (Figura 8, B, esquerda). Por outro lado, os estímulos optogenéticos inibitórios, indutores de um estado de hiperpolarização da membrana neuronal (Figura 8, A, direita), foram disponibilizados sob a forma de pulso contínuo por 3 segundos, a uma intensidade de 5 mW (Figura 8, B, direita).

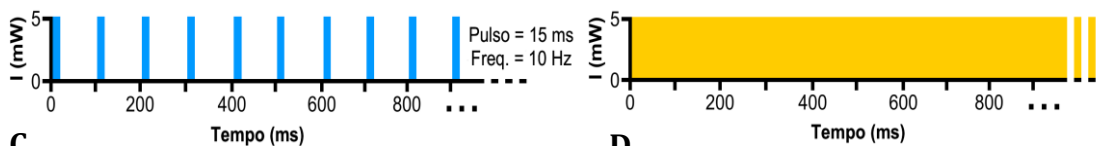
Os gráficos C e D da Figura 8 ilustram a atividade de um mesmo neurónio piramidal nas fases pré, pós e simultânea à estimulação optogenética. Como resultado da estimulação optogenética excitatória, verificou-se um aumento imediato da frequência de disparo do neurónio piramidal durante o período de estimulação, elevando a frequência para valores próximos de 20 Hz (Figura 8, C). Terminado o período de estimulação, os valores de frequência prontamente regressaram para níveis idênticos aos da fase de pré-

estimulação (≈ 5 Hz), sugerindo uma elevada acuidade e precisão temporal da resposta neuronal à cessação do estímulo luminoso.

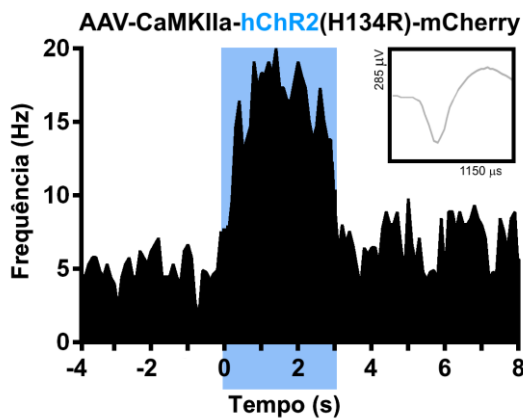
A



B



C



D

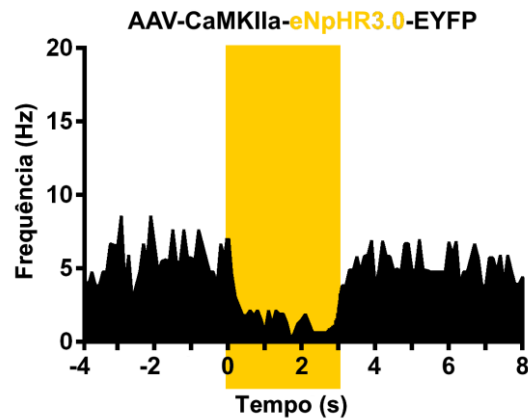


Figura 8 – Efeitos da estimulação optogenética no padrão de atividade de um neurónio piramidal do mPFC. (A) À esquerda, um esquema representativo do mecanismo de funcionamento da ChR2 que, mediante estimulação gerada por um LED azul (470 nm), promove influxo de Na^+ para o meio intracelular, produzindo uma despolarização da membrana e consequente excitação neuronal. À direita, está apresentado o mecanismo de ação da NpHR que, quando ativada por luz amarela (590 nm), conduz à hiperpolarização da membrana (induzida pelo influxo de Cl^-) e à consequente inibição neuronal. No centro, um esquema ilustrativo da matriz combinada de microelétrodos com uma fibra ótica e do respetivo transmissor *wireless*, implantada no mesmo local onde previamente foram injetados os vetores virais. (B) Padrões de estimulação optogenética excitatória (esquerda) e inibitória (direita) utilizados no estudo. (C) A estimulação optogenética gerada pelo LED azul (intensidade de 5 mW, pulso de 15 ms a 10 Hz) conduziu a um aumento da frequência de disparo do neurónio piramidal registado (teste Kolmogorov-Smirnov, $KS = 0,2053$, $p < 0,0001$). No quadrante superior direito está apresentada a forma da onda do neurónio registado. (D) A estimulação inibitória induzida pelo LED amarelo (pulso contínuo com intensidade de 5 mW) produziu uma redução da frequência de disparo do neurónio piramidal registado em (C) (teste Kolmogorov-Smirnov, $KS = 0,1625$, $p < 0,0001$).

A estimulação optogenética contínua no comprimento de onda de 590 nm conduziu a um silenciamento do neurónio registado, demonstrado pela imediata redução

da frequência de disparo, que persistiu durante o período de estimulação (Figura 8, D). Analogamente ao verificado com a estimulação optogenética excitatória, a cessação do estímulo luminoso teve efeitos imediatos, uma vez que os valores de frequência de disparo regressaram rapidamente para os níveis basais terminado o intervalo de estimulação.

1.3 – Efeito da estimulação optogenética de neurónios piramidais pré-frontais na performance de *working memory*

Posteriormente à demonstração da expressão das opsinas em neurónios piramidais do mPFC e à confirmação da sua funcionalidade, este trabalho procurou averiguar de que forma é que a estimulação optogenética desta população neuronal pode afetar a performance comportamental de roedores numa tarefa de WM. Para tal, procedeu-se ao registo da atividade de 32 neurónios, recolhidos de quatro animais distintos, durante a execução do paradigma comportamental *2-lever non-match choice*. O gráfico A da Figura 9 apresenta a frequência de disparo da população neuronal de 32 neurónios em função do tempo. A resposta da população registada adota um comportamento semelhante à atividade do neurónio piramidal apresentado anteriormente (Figura 8, C e D), sendo evidente um aumento e redução da frequência durante o período de estimulação optogenética excitatória e inibitória, respetivamente.

A estimulação optogenética foi realizada durante o período de espera entre-ensaios, tendo início no instante em que o *forced trial* terminou. Não se observaram diferenças significativas da performance comportamental entre os grupos controlo (sem estimulação optogenética), hChR2 (sujeito a estimulação optogenética excitatória) e eNpHR3.0 (sujeito a estimulação optogenética inibitória) para sessões teste com um intervalo entre-ensaios de 3 segundos (Figura 9, B). No entanto, para um tempo de espera de 6 segundos, observou-se uma redução da performance do grupo controlo relativamente ao tempo de espera de 3 segundos (Figura 9, C). Neste período temporal mais alargado, a análise ANOVA indicou a existência de diferenças significativas entre grupos experimentais ($F_{(2,10)} = 6,158$; $p = 0,0181$). Adicionalmente, a análise *post-hoc* revelou um aumento da percentagem de ensaios corretos do grupo eNpHR3.0 face ao grupo controlo (teste Bonferroni, $p < 0,05$). Desta forma, os resultados parecem indicar que a estimulação optogenética inibitória favorece a performance comportamental nesta tarefa de WM para tempos de espera entre-ensaios de 6 segundos, não exibindo efeitos significativos para curtos períodos de espera.

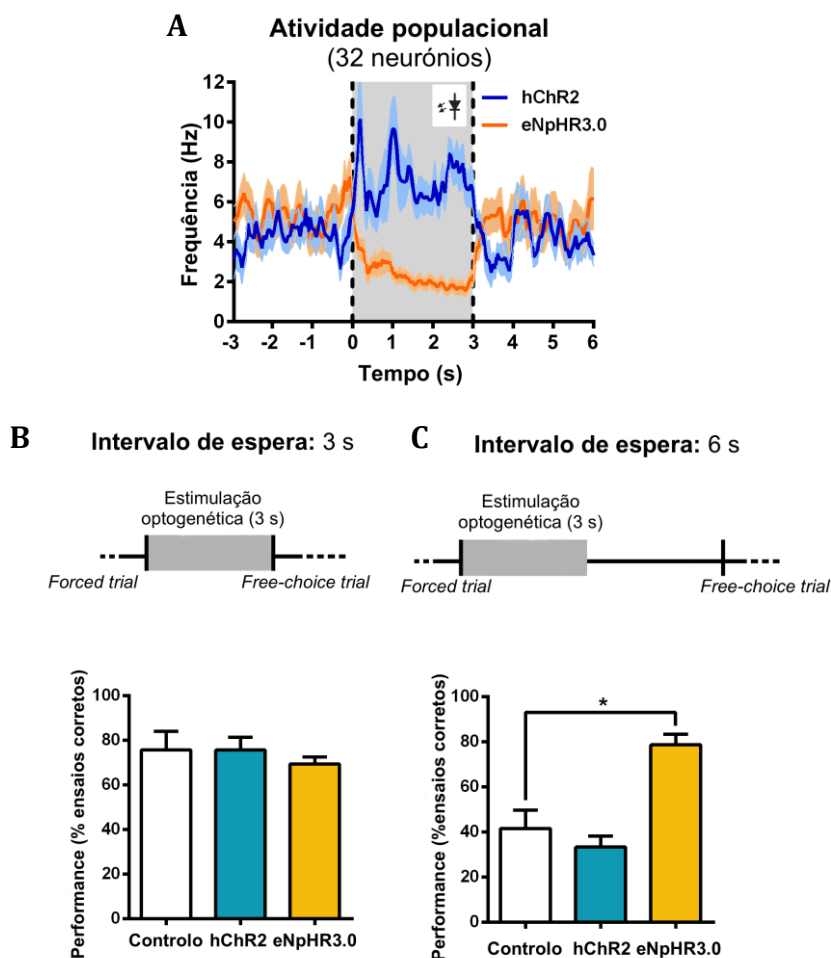


Figura 9 – Efeito da estimulação optogenética do mPFC na performance de WM. (A) A estimulação optogenética excitatória (pulso de 5 mW, 15 ms a 10 Hz) conduziu a um aumento da frequência de disparo da população neuronal registada. Por outro lado a estimulação optogenética inibitória (pulso contínuo a 5 mW) provocou a redução da frequência de disparo dos 32 neurónios registados. (B) A estimulação optogenética excitatória e inibitória não geraram efeitos na performance comportamental em sessões teste com intervalo de espera entre-ensaios de 3 segundos. (C) Em sessões teste com intervalo entre-ensaios de 6 segundos, foi notório um aumento da percentagem de ensaios corretos quando se procedeu à estimulação optogenética inibitória (ativação da NpHR). Os valores são apresentados como média \pm erro padrão da média. As comparações entre grupos experimentais são baseadas no teste *one-way* ANOVA, seguidas de um teste *post-hoc* Bonferroni. * $p < 0,05$.

De seguida, procurou-se investigar se a atividade da população neuronal em estudo é afetada no instante em que o animal tem que optar por uma das duas alavancas no *free-choice trial* e se a estimulação optogenética inibitória induz alguma alteração neste padrão de disparo neuronal. Para tal, foi calculada a atividade populacional dos grupos controlo e eNpHR3.0 para o intervalo de tempo que compreende os três segundos que antecederam o pressionar da alavanca (*free-choice*), o instante em que esta foi premida e os seis segundos posteriores, em ensaios corretos e incorretos, com tempo de espera entre-ensaios de 6 segundos (Figura 10). Os resultados indicaram que nos ensaios corretos, no momento que antecede o pressionar da alavanca, bem como no preciso instante em que esta é pressionada, a atividade de disparo de determinados

neurónios aumenta, ao contrário do que se verifica nos ensaios incorretos, em que, nos mesmos pontos temporais, a atividade é mínima. Neste último caso, em ambas as condições (estimulação optogenética ou ausência desta), nota-se uma pequena elevação da atividade neuronal, aproximadamente 1 segundo após ter sido tomada a escolha errada. Comparativamente com a condição controlo, nos ensaios corretos a estimulação optogenética inibitória induz um aumento considerável da atividade neuronal no instante que antecede o pressionar da alavanca e no próprio instante em que esta é premida. No entanto, nos ensaios incorretos não se observaram efeitos significativos da estimulação optogenética inibitória.

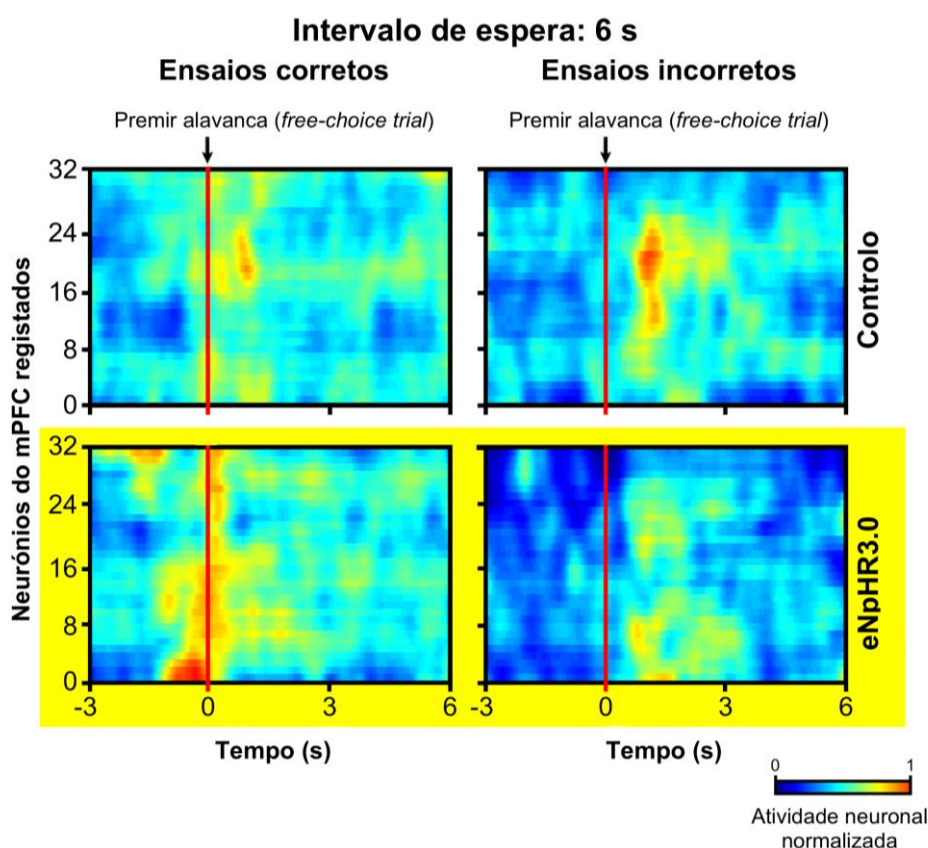


Figura 10 – Atividade neuronal peri-evento em ensaios corretos ou incorretos com intervalo de espera de 6 segundos. Estão apresentados quatro *rasters* coloridos (resolução temporal de 50 ms) que ilustram as atividades individuais (normalizadas) dos 32 neurónios registados (alinhados horizontalmente) peri-evento (premir alavanca, representado por uma linha vertical vermelha), em ensaios corretos (esquerda) e incorretos (direita). A atividade neuronal peri-evento em ensaios corretos aumenta, contrariamente ao verificado em ensaios incorretos, onde a atividade é reduzida. Nos ensaios corretos, a estimulação optogenética inibitória levou a um aumento da atividade neuronal peri-evento, em relação à condição controlo. Nos ensaios incorretos não se observaram efeitos significativos da estimulação optogenética inibitória.

Tarefa 2 – Estudo do efeito da modulação dos recetores de dopamina D2 na performance de *working memory* num modelo animal de dor neuropática

Com o objetivo de avaliar o impacto da dor neuropática no desempenho comportamental de WM e qual o papel da modulação dos recetores dopaminérgicos D2 neste processo, estabeleceram-se três grupos experimentais: grupo controlo (sem intervenção cirúrgica e apenas sujeitos a administração IP salina, $n = 4$), grupo *sham* (animais sujeitos a intervenção *sham* e a administração IP do antagonista D2 raclopride, $n = 4$) e grupo SNI (modelo de dor neuropática, sujeito a administração IP de raclopride, $n = 4$).

2.1 – Avaliação dos níveis de *threshold* mecânico dos grupos experimentais

Os resultados (Figura 11) demonstraram que os animais do grupo SNI apresentam maior sensibilidade a estímulos dolorosos (alodínia), facto evidenciado pela redução dos níveis de *threshold* a estímulos mecânicos. Observaram-se diferenças estatisticamente significativas entre grupos experimentais ($F_{(2,9)} = 22,000$; $p = 0,0003$), tendo a análise *post-hoc* revelado que o *threshold* mecânico no grupo SNI se encontra reduzido face aos níveis de *threshold mecânico* do grupo controlo (teste Bonferroni, $p < 0,001$), não havendo diferenças significativas entre os grupos controlo e *sham*.

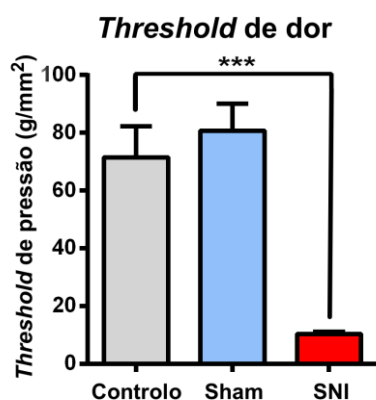


Figura 11 – Nível de sensibilidade mecânica medido pela resposta à estimulação com monofilamentos de von Frey. Destaca-se a redução significativa dos valores de *threshold* necessários para induzir uma resposta de retração da pata estimulada no grupo SNI, comparativamente com o grupo controlo. Os valores são apresentados sob a forma de média \pm erro padrão da média. As comparações entre grupos experimentais são baseadas no teste *one-way* ANOVA, seguidas de um teste *post-hoc* Bonferroni. *** $p < 0,001$.

2.2 – Efeito do raclopride na performance comportamental de *working memory*

O desempenho comportamental dos três grupos experimentais no paradigma 2-*lever non-match choice* foi avaliado em sessões teste com intervalos de espera entre-

ensaios de 3 e 6 segundos, 20 minutos após a injeção IP de raclopride (ou controlo salino). A administração sistémica de raclopride não produziu diferenças significativas ($F_{(2,9)} = 2,351$; $p = 0,1509$) na performance comportamental entre os grupos para o intervalo de espera de 3 segundos (Figura 12, A). Contudo, num intervalo de espera mais alargado (6 segundos), a análise ANOVA indicou a existência de diferenças estatisticamente significativas entre os grupos experimentais analisados ($F_{(2,9)} = 4,589$; $p = 0,0423$). O teste *post-hoc* revelou que a administração sistémica de raclopride nos animais com lesão do nervo ciático elevou significativamente a percentagem de ensaios corretos, face ao grupo controlo (Figura 12, B).

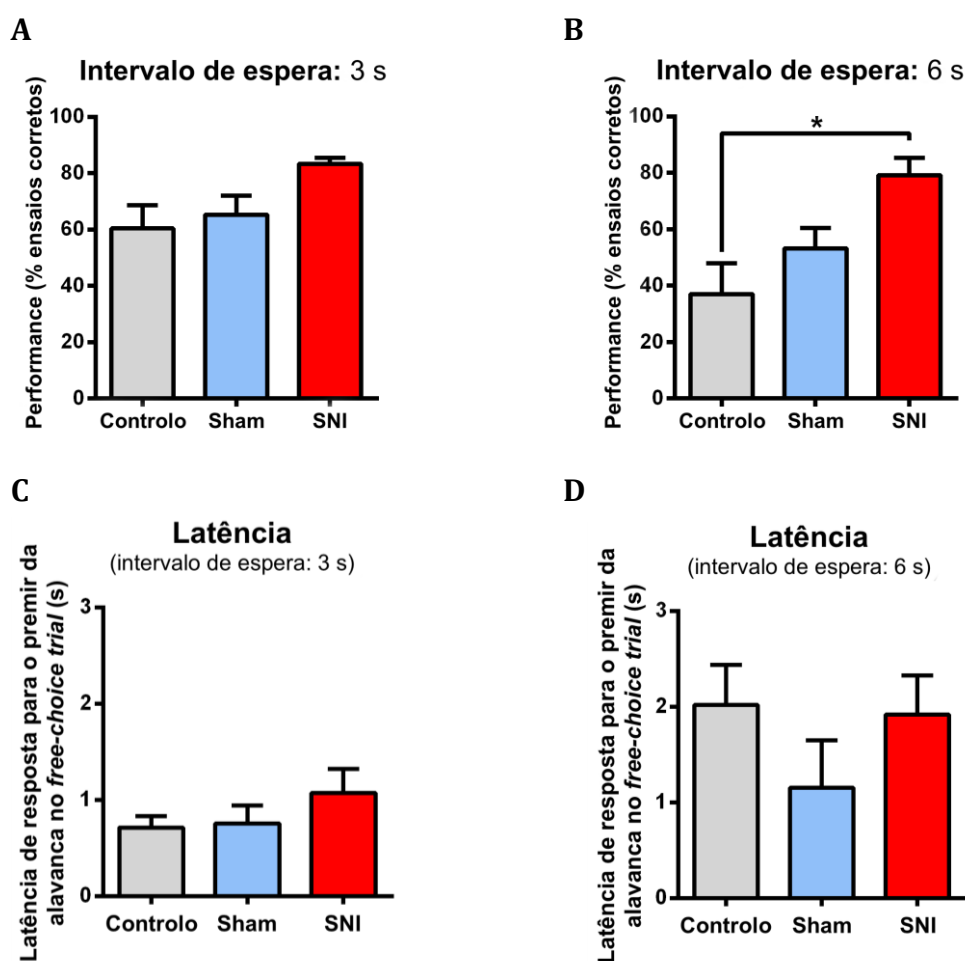


Figura 12 – Efeito da administração de raclopride na performance comportamental. (A) A administração sistémica de raclopride não gerou efeitos significativos na percentagem de ensaios corretos para intervalos de espera de 3 segundos. (B) O raclopride induziu um aumento significativo da performance comportamental do grupo SNI, comparativamente com o grupo controlo. (C-D) Não foram observadas diferenças significativas inter-grupos nos tempos de latência da resposta para o premir da alavanca no *free-choice trial* em ambos os intervalos de espera. Os valores são apresentados sob a forma de média \pm erro padrão da média. As comparações entre grupos experimentais são baseadas no teste *one-way* ANOVA.

Adicionalmente, foram determinados os tempos de latência da resposta para os dois intervalos de espera, que consistem no intervalo temporal desde o momento em que

as alavancas são apresentadas (início do *free-choice trial*) até ao instante em que uma delas é pressionada (final do *free-choice trial*). Não foram observadas diferenças significativas entre grupos no que respeita à latência da resposta comportamental para ambos os intervalos de espera entre-ensaios (Figura 12, C e D). No entanto, qualitativamente, parece haver um aumento dos valores do tempo de latência da resposta para ensaios em que o intervalo de espera é superior.

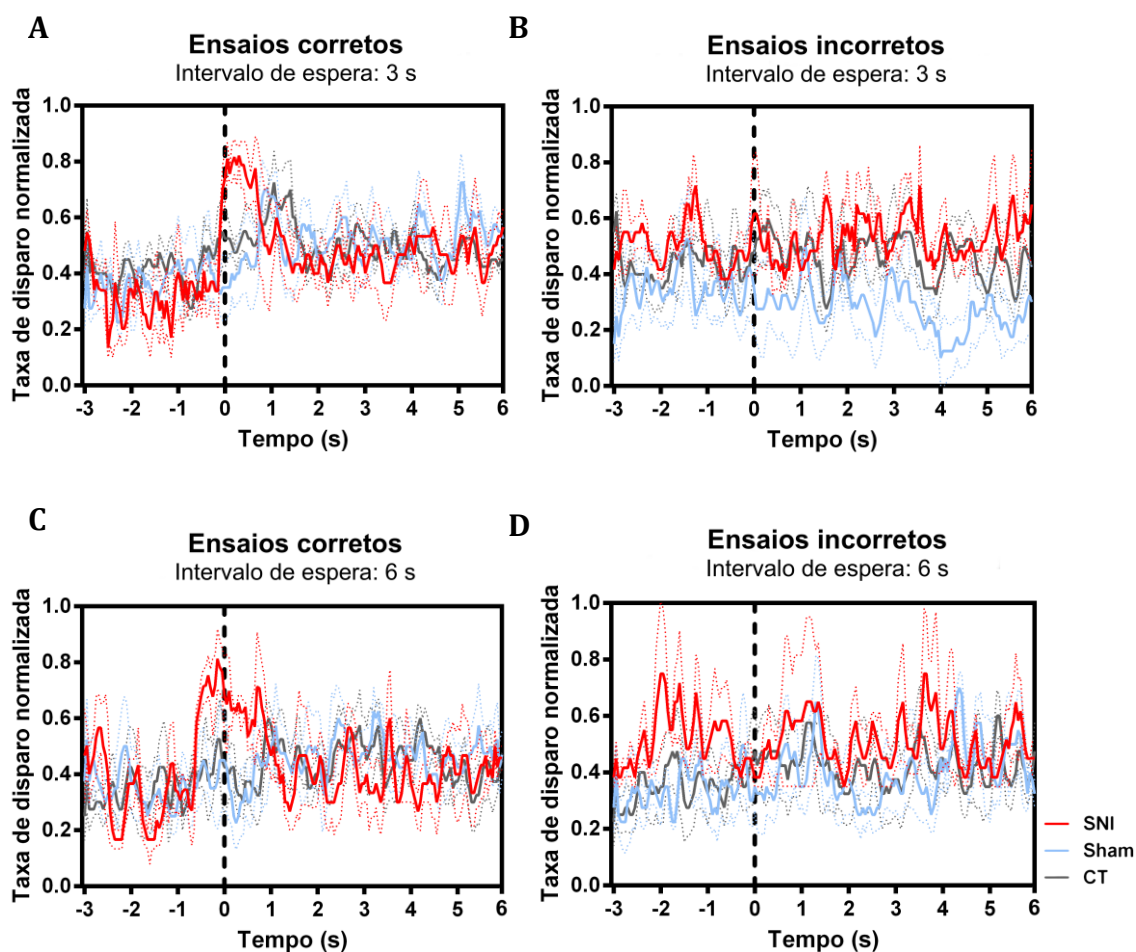


Figura 13 – Atividade populacional peri-evento em ensaios corretos e incorretos. (A) Em ensaios corretos e cujo tempo de espera é de 3 segundos, a atividade populacional do grupo SNI eleva-se no instante em que o animal prime a alavanca do *free-choice trial* (linha tracejada vertical). (C) Quando o intervalo temporal de espera é de 6 segundos, observa-se um pico de atividade em instantes anteriores ao pressionar da alavanca para o grupo SNI. (B e D) Nos ensaios incorretos, verifica-se uma irregularidade da taxa de disparo populacional do grupo SNI, essencialmente para intervalos de espera entre-ensaios de 6 segundos. A resolução temporal dos gráficos apresentados é de 50 ms. Os valores são apresentados como média \pm erro padrão da média.

Com a finalidade de averiguar se a atividade de disparo neuronal é afetada no instante em que o animal pressiona a alavanca no *free-choice trial*, nos três segundos anteriores e nos seis segundos posteriores, foi calculada a atividade populacional para os três grupos experimentais, nos ensaios corretos e incorretos (Figura 13). Nos ensaios

corretos, a administração de raclopride em animais com lesão do nervo ciático produziu um pico de atividade populacional no instante em que a alavanca é pressionada ($t = 0$ s), para um intervalo de espera entre-ensaios de 3 segundos (Figura 13, A). Esta elevação de atividade é transiente e após cerca de 1 segundo regride para valores semelhantes aos da fase precedente ao premir da alavanca. Para um intervalo de espera de 6 segundos, é também notável o aparecimento de um pico de atividade neuronal do mesmo grupo experimental (SNI tratado com raclopride), mas, nesta situação, o aumento da atividade ocorre em instantes anteriores ao pressionar da alavanca ($t \approx -0,7$ segundos), regredindo para valores basais após o premir da alavanca. No que diz respeito aos ensaios incorretos (Figura 13, B e D), verifica-se uma irregularidade da taxa de disparo populacional do grupo SNI, particularmente para intervalos de espera entre-ensaios de 6 segundos (Figura 13, D).

DISCUSSÃO

Nesta dissertação, os trabalhos desenvolvidos permitiram-me estudar de que forma a modulação optogenética da atividade de neurónios piramidais pré-frontais pode contribuir para a manifestação de alterações na performance de *working memory* espacial. Em segundo lugar, o meu objetivo foi estudar qual o papel da sinalização dopaminérgica na redução da performance de *working memory* evidenciada em condições de dor prolongada. Para esse objetivo, foi promovida a modulação farmacológica dos recetores de dopamina do tipo D2, e, em simultâneo, promovida a avaliação das alterações da atividade neuronal do mPFC durante a demanda cognitiva. Os resultados obtidos demonstraram que a inibição optogenética da população de neurónios piramidais no mPFC está correlacionada com um efeito pró-cognitivo, através de um aumento da performance dos animais na tarefa de *working memory*, em particular quando são impostos períodos mais longos para retenção de informação necessária à correta seleção da localização da recompensa. Esse efeito também foi observado em animais sujeitos a um modelo animal de dor neuropática, por lesão periférica do nervo ciático, nos quais a administração sistémica de raclopride (antagonista de recetores de dopamina D2) provou estar associada a níveis de performance mais elevados na mesma tarefa de *working memory*.

É importante referir que em ambos os estudos desenvolvidos foi utilizada uma tarefa de *working memory* espacial, num paradigma do tipo *2-lever non-match choice* (DNMS), tendo sido testados dois níveis de complexidade, pela aplicação de dois tipos de intervalos para a retenção de informação crucial para a localização da recompensa. Uma característica deste tipo de tarefas para a avaliação de *working memory* é precisamente a existência de um intervalo de tempo entre o primeiro estímulo ou resposta e a segunda resposta. Tal intervalo compreende o período no qual deverá ser mantida em memória uma retrospectiva do primeiro estímulo ou resposta, de forma a alcançar a resposta correta numa futura decisão. Os meus resultados demonstraram existir um aumento dos erros cometidos pelos animais quando o período de espera entre-ensaios é aumentado, o que apresenta concordância com estudos que reportaram que longos períodos de espera conduzem ao aumento do grau de dificuldade da tarefa (Lee *et al.*, 2003; Rossi *et al.*, 2012). Nesta situação, verificou-se que quando o animal toma uma decisão correta, ou seja, mantém em memória a alavanca premida no *forced trial* e pressiona a alavanca oposta no *free-choice trial*, a estimulação optogenética inibitória dos neurónios piramidais durante o período de espera (entre ensaios) é acompanhada por um aumento da atividade populacional do mPFC que ocorre após a seleção da alavanca correta. É importante também referir que esse aumento é mais significativo quando a performance é superior. Este aumento da atividade neuronal pode constituir uma explicação para a elevação dos níveis de performance dos animais submetidos a este tipo de estimulação,

face a animais não estimulados optogeneticamente. Alguns estudos revelaram que a atividade dos neurónios do PFC não é independente e está correlacionada (Jung *et al.*, 1998; Baeg *et al.*, 2003). Todavia, a dinâmica neuronal durante os processos de *working memory* é mais complexa do que uma simples reverberação da atividade neuronal do PFC para a manutenção da memória retrospectiva durante a demanda cognitiva. Estudos neuroeletrofisiológicos demonstraram que a performance de *working memory* está correlacionada com alterações na atividade do mPFC e da formação hipocampal, em particular através de oscilações na banda de frequência *theta* (Hyman *et al.*, 2005; Siapas *et al.*, 2005; Sirota *et al.*, 2008), as quais são mais evidentes no instante imediato que antecede uma decisão correta e são reduzidas quando são tomadas decisões incorretas (Jones *et al.*, 2005; Cardoso-Cruz *et al.*, 2013a). Estas observações são também apoiadas pelo facto de alguns estudos terem demonstrado que a lesão ou inativação temporária do mPFC é responsável pela manifestação de défices de performance nessas tarefas (Floresco *et al.*, 1997; Wang *et al.*, 2006), indicando que o mPFC desempenha um papel crucial nesta função cognitiva.

A estimulação optogenética excitatória, por outro lado, não demonstrou efeitos significativos na performance comportamental em ambos os períodos de espera entre-ensaios utilizados. No entanto, para um tempo de retenção de 6 segundos parece haver qualitativamente uma pequena redução da performance comportamental após indução da despolarização dos neurónios piramidais, gerada pela estimulação luminosa. A ativação excessiva de neurónios piramidais, por vezes resultante da desregulação da inibição mediada pelos interneurónios GABAérgicos (Rao *et al.*, 2000b), é observada em patologias como a esquizofrenia (Lewis *et al.*, 2005; Farzan *et al.*, 2010), que está associada a défices em funções cognitivas, como a atenção (Sitskoorn *et al.*, 2004), comportamento social (Yizhar *et al.*, 2011; Cho *et al.*, 2014) e *working memory* (Park *et al.*, 1992; Green, 2006). Os neurónios piramidais são especializados em transmitir informações entre áreas corticais (Degenetais *et al.*, 2002) e, como tal, a afinação precisa do balanço de ativação/inibição este tipo neuronal é crucial para o correto funcionamento dos processos cognitivos associados ao mPFC (Yizhar *et al.*, 2011). A estimulação optogenética excitatória realizada no intervalo entre-ensaios poderá funcionar como uma fonte de ruído no mecanismo circuitário pré-frontal, que regula o equilíbrio excitação/inibição estabelecido, necessário para o correto desempenho da *working memory*, o que justifica a ligeira quebra da performance dos animais submetidos a este tipo de estimulação.

Os resultados deste trabalho, tal como observado em estudos anteriores, ressalvam ainda a ideia de que condições de dor crónica prolongada podem contribuir

para perturbações do balanço e sinalização dopaminérgica (Pais-Vieira *et al.*, 2009), e de que a performance de *working memory* está estreitamente correlacionada com alterações nesse balanço (Sawaguchi *et al.*, 1991; Broersen *et al.*, 1994; Murphy *et al.*, 1996). No entanto, é importante referir que os achados do presente estudo divergem dos resultados de diversas investigações que sugerem que os recetores D2-like desempenham um papel pouco relevante na execução de tarefas comportamentais que envolvam a *working memory* (Sawaguchi *et al.*, 1991, 1994; Seamans *et al.*, 1998). A injeção de raclopride, antagonista dos recetores DA D2, foi capaz de favorecer a performance numa tarefa de *working memory* de animais previamente submetidos a uma lesão do nervo ciático, para um tempo de espera entre-ensaios mais elevado, revelando um efeito dependente do período de espera. Foi já reportado que a administração bilateral intracortical de sulpiride (antagonista DA D2) produziu um aumento da precisão das respostas no paradigma de *working memory* U-maze (Druzin *et al.*, 2000). No entanto, o estudo mencionado foi realizado em animais não sujeitos a condições dolorosas, não contemplando o impacto que a dor persistente causa na performance de *working memory*.

Os resultados obtidos indicaram ainda que a administração sistémica de raclopride (previamente às sessões de registo) em animais SNI produziu alterações no padrão de atividade neuronal, particularmente nos instantes próximos ao momento em que a alavanca do *free-choice trial* foi pressionada. Em ensaios corretos e cujo intervalo entre-ensaios foi de 3 e 6 segundos, foi visível o desenvolvimento de um pico de atividade apenas dos neurónios registados do grupo SNI, nos instantes em que ocorre a seleção da alavanca correta, situação não verificada para os ensaios incorretos, onde se nota uma irregularidade da taxa de disparo populacional. A elevação da atividade neuronal (após administração sistémica de raclopride) no momento em que uma decisão correta é tomada parece, mais uma vez, estar de acordo com a literatura (Floresco *et al.*, 1997; Jones *et al.*, 2005) e correlacionada com um aumento da performance, embora apenas significativa para o intervalo de maior duração da retenção de informação. O facto de se observar um aumento da atividade neuronal após bloqueio dos recetores D2 em animais com dor persistente pode ser explicado pelos efeitos que este bloqueio produz na população neuronal pré-frontal. Foi demonstrado que a ativação destes recetores por agonistas D2 atenuam a excitabilidade dos neurónios piramidais excitatórios (Gulledge *et al.*, 1998; Tseng *et al.*, 2004) e ativam interneurónios GABAérgicos *fast-spiking* (Tseng *et al.*, 2004, 2007), que exercem um efeito inibitório sobre os neurónios piramidais. Como tal, a ação do antagonista D2 poderá induzir a facilitação da atividade de disparo dos neurónios piramidais, por ação direta sobre este tipo celular, ou por ação indireta, através da redução do controlo inibitório exercido pelos interneurónios *fast-spiking* sobre a população piramidal, culminando no aumento da taxa de disparo populacional observado.

Todavia, é importante referir que pelo facto da estimulação dos recetores D2 ter sido efetuada por infusão sistémica, não é descartada a hipótese de que as alterações observadas ao nível celular no mPFC sejam também resultado da atuação do raclopride em outras regiões do cérebro, ou que possam ter uma dependência direta da concentração utilizada. Nesse sentido é importante ressaltar o facto de que a seleção da concentração aplicada assentou em dois fatores essenciais, estando o primeiro relacionado com a utilização da concentração mais baixa para obter um efeito na atividade do mPFC, e o segundo relacionado com a seleção de uma concentração que não permita causar défices motores que possam comprometer a correta performance da tarefa comportamental.

Em conclusão, foram observadas reduções da performance num paradigma comportamental de *working memory* quando aumentado o tempo de espera entre-ensaios, situação revertida pela prévia estimulação optogenética inibitória de neurónios piramidais, que, em ensaios corretos, fez elevar a taxa de disparo populacional da região do mPFC registada. Adicionalmente, verificou-se num modelo animal de dor neuropática que também a administração sistémica de raclopride eleva significativamente a percentagem de sucesso no mesmo paradigma comportamental, para maiores intervalos de espera entre-ensaios, condição que surge correlacionada com um aumento da atividade neuronal pré-frontal durante a correta seleção da alavanca que desbloqueia a recompensa. A modulação da atividade de neurónios piramidais e dos recetores de dopamina D2 podem constituir importantes alvos de ação que procurem a restituição da atividade do PFC e reversão de défices de *working memory* associados à persistência de síndromes dolorosas.

CONSIDERAÇÕES FINAIS

Com a elaboração deste projeto, procurei contribuir para o atual conhecimento do mPFC e do seu reconhecido papel no processo de *working memory* na ausência e presença de condições dolorosas. Em ambas as condições, investiguei o papel da modulação de recetores de dopamina D2 na estabilidade dos circuitos neuronais pré-frontais relevantes para a WM.

Os resultados evidenciaram um efeito benéfico da estimulação optogenética inibitória ao nível da performance de WM para períodos mais longos de retenção de informação necessária à correta seleção da localização da recompensa. Como tal, a optogenética parece constituir uma útil ferramenta para o estudo dos circuitos do mPFC em processos cognitivos. No futuro, seria aliciante investigar se a estimulação optogenética de neurónios piramidais poderá contribuir para o restabelecimento dos normais padrões de atividade pré-frontais em modelos animais de dor neuropática, onde estão reportados défices de WM. Por outro lado, seria também interessante empregar a optogenética para a estimulação seletiva da população de interneurónios GABAérgicos pré-frontais em condições dolorosas, com o objetivo de restaurar a sua normal atividade regulatória, comprometida nestas condições.

Relativamente ao estudo da modulação de recetores de dopamina D2, os resultados demonstraram um efeito benéfico da administração sistémica de raclopride (antagonista destes recetores) em animais com dor persistente no desempenho de uma tarefa de WM. Ao contrário dos recetores de dopamina D1, o papel dos recetores D2 na WM e na dor é ainda controverso e tal facto instiga o desenvolvimento de novos estudos que visem caracterizar o efeito da modulação dopaminérgica no PFC em síndromes de dor crónica, estudos esses de relevância clínica acrescida. Seria pertinente analisar e comparar os efeitos da administração sistémica vs. local (mPFC) de raclopride, tanto ao nível comportamental como eletrofisiológico. Penso que também seria relevante avaliar a resposta comportamental e eletrofisiológica após administração local de um gradiente de concentrações de raclopride ou quimpirol (agonista de recetores de dopamina D2/D3), o que permitiria uma melhor caracterização do perfil modulatório destes recetores em processos de WM.

Futuras investigações envolvendo a estimulação optogenética ou modulação dopaminérgica pré-frontal podem constituir a base de potenciais estratégias terapêuticas que procurem restituir o normal funcionamento do PFC, da sua conectividade com outras estruturas cerebrais e das suas funções cognitivas em pacientes com síndromes dolorosas.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

Aguiar P, Mendonça L, Galhardo V (2007) OpenControl: a free opensource software for video tracking and automated control of behavioral mazes. *Journal of neuroscience methods* 166:66-72.

Amico F, Spowart-Manning L, Anwyl R, Rowan MJ (2007) Performance- and task-dependent effects of the dopamine D1/D5 receptor agonist SKF 38393 on learning and memory in the rat. *European journal of pharmacology* 577:71-77.

Aravanis AM, Wang LP, Zhang F, Meltzer LA, Mogri MZ, Schneider MB, Deisseroth K (2007) An optical neural interface: in vivo control of rodent motor cortex with integrated fiberoptic and optogenetic technology. *Journal of neural engineering* 4:S143-156.

Arnsten AF (1997) Catecholamine regulation of the prefrontal cortex. *Journal of psychopharmacology* 11:151-162.

Baddeley A (1986) *Working Memory*. Oxford: Oxford University Press.

Baeg EH, Kim YB, Huh K, Mook-Jung I, Kim HT, Jung MW (2003) Dynamics of population code for working memory in the prefrontal cortex. *Neuron* 40:177-188.

Bamann C, Kirsch T, Nagel G, Bamberg E (2008) Spectral characteristics of the photocycle of channelrhodopsin-2 and its implication for channel function. *Journal of molecular biology* 375:686-694.

Bamberg E, Tittor J, Oesterhelt D (1993) Light-driven proton or chloride pumping by halorhodopsin. *Proc Natl Acad Sci U S A* 90:639-643.

Barbas H, Blatt GJ (1995) Topographically specific hippocampal projections target functionally distinct prefrontal areas in the rhesus monkey. *Hippocampus* 5:511-533.

Bechara A, Damasio AR, Damasio H, Anderson SW (1994) Insensitivity to future consequences following damage to human prefrontal cortex. *Cognition* 50:7-15.

Benes FM, Berretta S (2001) GABAergic interneurons: implications for understanding schizophrenia and bipolar disorder. *Neuropsychopharmacology : official publication of the American College of Neuropsychopharmacology* 25:1-27.

Boyden ES, Zhang F, Bamberg E, Nagel G, Deisseroth K (2005) Millisecond-timescale, genetically targeted optical control of neural activity. *Nature neuroscience* 8:1263-1268.

Brodmann K (1909) Vergleichende Lokalisationslehre der Gro hirnrinde in ihren Prinzipien dargestellt auf Grund des Zellenbaues: Leipzig: Barth.

Broersen LM, Heinsbroek RP, de Bruin JP, Joosten RN, van Hest A, Olivier B (1994) Effects of local application of dopaminergic drugs into the dorsal part of the medial prefrontal cortex of rats in a delayed matching to position task: comparison with local cholinergic blockade. Brain research 645:113-122.

Buchanan SL, Thompson RH, Maxwell BL, Powell DA (1994) Efferent connections of the medial prefrontal cortex in the rabbit. Experimental brain research 100:469-483.

Butler SH, Godefroy F, Besson JM, Weil-Fugazza J (1992) A limited arthritic model for chronic pain studies in the rat. Pain 48:73-81.

Cai JXA, A. F. (1997) Dose-dependent effects of the dopamine D1 receptor agonists A77636 or SKF81297 on spatial working memory in aged monkeys. The Journal of pharmacology and experimental therapeutics 283:183-189.

Cain CK, Francis JM, Plone MA, Emerich DF, Lindner MD (1997) Pain-related disability and effects of chronic morphine in the adjuvant-induced arthritis model of chronic pain. Physiology & behavior 62:199-205.

Cardoso-Cruz H, Lima D, Galhardo V (2013a) Impaired spatial memory performance in a rat model of neuropathic pain is associated with reduced hippocampus-prefrontal cortex connectivity. The Journal of neuroscience : the official journal of the Society for Neuroscience 33:2465-2480.

Cardoso-Cruz H, Sousa M, Vieira JB, Lima D, Galhardo V (2013b) Prefrontal cortex and mediodorsal thalamus reduced connectivity is associated with spatial working memory impairment in rats with inflammatory pain. Pain 154:2397-2406.

Cardoso-Cruz H, Dourado M, Monteiro C, Matos MR, Galhardo V (2014) Activation of dopaminergic D2/D3 receptors modulates dorsoventral connectivity in the hippocampus and reverses the impairment of working memory after nerve injury. The Journal of neuroscience : the official journal of the Society for Neuroscience 34:5861-5873.

Carr DB, Sesack SR (1996) Hippocampal afferents to the rat prefrontal cortex: synaptic targets and relation to dopamine terminals. The Journal of comparative neurology 369:1-15.

Cavada C, Llamas A, Reinoso-Suarez F (1983) Allocortical afferent connections of the prefrontal cortex in the cat. *Brain research* 260:117-120.

Cho KK, Sohal VS (2014) Optogenetic approaches for investigating neural pathways implicated in schizophrenia and related disorders. *Human molecular genetics* 23:R64-68.

Cobb SR, Buhl EH, Halasy K, Paulsen O, Somogyi P (1995) Synchronization of neuronal activity in hippocampus by individual GABAergic interneurons. *Nature* 378:75-78.

Coffeen U, Lopez-Avila A, Ortega-Legaspi JM, del Angel R, Lopez-Munoz FJ, Pellicer F (2008) Dopamine receptors in the anterior insular cortex modulate long-term nociception in the rat. *European journal of pain* 12:535-543.

Conde F, Maire-Lepoivre E, Audinat E, Crepel F (1995) Afferent connections of the medial frontal cortex of the rat. II. Cortical and subcortical afferents. *The Journal of comparative neurology* 352:567-593.

Constantinidis C, Goldman-Rakic PS (2002) Correlated discharges among putative pyramidal neurons and interneurons in the primate prefrontal cortex. *Journal of neurophysiology* 88:3487-3497.

Cools R, Stefanova E, Barker RA, Robbins TW, Owen AM (2002) Dopaminergic modulation of high-level cognition in Parkinson's disease: the role of the prefrontal cortex revealed by PET. *Brain : a journal of neurology* 125:584-594.

Covington HE, 3rd, Lobo MK, Maze I, Vialou V, Hyman JM, Zaman S, LaPlant Q, Mouzon E, Ghose S, Tamminga CA, Neve RL, Deisseroth K, Nestler EJ (2010) Antidepressant effect of optogenetic stimulation of the medial prefrontal cortex. *The Journal of neuroscience : the official journal of the Society for Neuroscience* 30:16082-16090.

Crick FH (1979) Thinking about the brain. *Scientific American* 241:219-232.

Dang YH, Zhao Y, Xing B, Zhao XJ, Huo FQ, Tang JS, Qu CL, Chen T (2010) The role of dopamine receptors in ventrolateral orbital cortex-evoked anti-nociception in a rat model of neuropathic pain. *Neuroscience* 169:1872-1880.

Decosterd I, Woolf CJ (2000) Spared nerve injury: an animal model of persistent peripheral neuropathic pain. *Pain* 87:149-158.

DeFelipe J, Farinas I (1992) The pyramidal neuron of the cerebral cortex: morphological and chemical characteristics of the synaptic inputs. *Progress in neurobiology* 39:563-607.

Degenetais E, Thierry AM, Glowinski J, Gioanni Y (2002) Electrophysiological properties of pyramidal neurons in the rat prefrontal cortex: an in vivo intracellular recording study. *Cerebral cortex* 12:1-16.

Deisseroth K (2011) Optogenetics. *Nature methods* 8:26-29.

Dent MF, Neill DB (2012) Dose-dependent effects of prefrontal dopamine on behavioral state in rats. *Behavioral neuroscience* 126:620-639.

Dick BD, Rashiq S (2007) Disruption of attention and working memory traces in individuals with chronic pain. *Anesthesia and analgesia* 104:1223-1229, tables of contents.

Douglas R, Martin KAC (1990) Neocortex. In: *The Synaptic Organisation of the Brain*, 3rd Edition (Shepherd GM, ed), pp 389-438: Oxford University Press.

Dreher JC, Burnod Y (2002) An integrative theory of the phasic and tonic modes of dopamine modulation in the prefrontal cortex. *Neural networks : the official journal of the International Neural Network Society* 15:583-602.

Druzin MY, Kurzina NP, Malinina EP, Kozlov AP (2000) The effects of local application of D2 selective dopaminergic drugs into the medial prefrontal cortex of rats in a delayed spatial choice task. *Behavioural brain research* 109:99-111.

Dudchenko PA (2004) An overview of the tasks used to test working memory in rodents. *Neuroscience and biobehavioral reviews* 28:699-709.

Eccleston C (1994) Chronic pain and attention: a cognitive approach. *The British journal of clinical psychology / the British Psychological Society* 33 (Pt 4):535-547.

Farzan F, Barr MS, Levinson AJ, Chen R, Wong W, Fitzgerald PB, Daskalakis ZJ (2010) Evidence for gamma inhibition deficits in the dorsolateral prefrontal cortex of patients with schizophrenia. *Brain : a journal of neurology* 133:1505-1514.

Fenno L, Yizhar O, Deisseroth K (2011) The development and application of optogenetics. *Annual review of neuroscience* 34:389-412.

Floresco SB (2013) Prefrontal dopamine and behavioral flexibility: shifting from an "inverted-U" toward a family of functions. *Frontiers in neuroscience* 7:62.

Floresco SB, Phillips AG (2001) Delay-dependent modulation of memory retrieval by infusion of a dopamine D1 agonist into the rat medial prefrontal cortex. *Behavioral neuroscience* 115:934-939.

Floresco SB, Seamans JK, Phillips AG (1997) Selective roles for hippocampal, prefrontal cortical, and ventral striatal circuits in radial-arm maze tasks with or without a delay. *The Journal of neuroscience : the official journal of the Society for Neuroscience* 17:1880-1890.

Fuster JM (1990) Behavioral electrophysiology of the prefrontal cortex of the primate. *Progress in brain research* 85:313-323; discussion 323-314.

Fuster JM (2001) The prefrontal cortex--an update: time is of the essence. *Neuron* 30:319-333.

Gabbott P, Headlam A, Busby S (2002) Morphological evidence that CA1 hippocampal afferents monosynaptically innervate PV-containing neurons and NADPH-diaphorase reactive cells in the medial prefrontal cortex (Areas 25/32) of the rat. *Brain research* 946:314-322.

Gabbott PL, Dickie BG, Vaid RR, Headlam AJ, Bacon SJ (1997) Local-circuit neurones in the medial prefrontal cortex (areas 25, 32 and 24b) in the rat: morphology and quantitative distribution. *The Journal of comparative neurology* 377:465-499.

Gabbott PL, Warner TA, Jays PR, Salway P, Busby SJ (2005) Prefrontal cortex in the rat: projections to subcortical autonomic, motor, and limbic centers. *The Journal of comparative neurology* 492:145-177.

Gao WJ, Goldman-Rakic PS (2003) Selective modulation of excitatory and inhibitory microcircuits by dopamine. *Proc Natl Acad Sci U S A* 100:2836-2841.

Gaspar P, Bloch B, Le Moine C (1995) D1 and D2 receptor gene expression in the rat frontal cortex: cellular localization in different classes of efferent neurons. *The European journal of neuroscience* 7:1050-1063.

Glickstein SB, Hof PR, Schmauss C (2002) Mice lacking dopamine D2 and D3 receptors have spatial working memory deficits. *The Journal of neuroscience : the official journal of the Society for Neuroscience* 22:5619-5629.

Goldman PSR, H. E. (1970) Localization of function within the dorsolateral prefrontal cortex of the rhesus monkey. *Experimental neurology* 27:291-304.

Goldman-Rakic PS (1990) Cellular and circuit basis of working memory in prefrontal cortex of nonhuman primates. *Progress in brain research* 85:325-335; discussion 335-326.

Goldman-Rakic PS (1994) Working memory dysfunction in schizophrenia. *The Journal of neuropsychiatry and clinical neurosciences* 6:348-357.

Goldman-Rakic PS, Selemon LD, Schwartz ML (1984) Dual pathways connecting the dorsolateral prefrontal cortex with the hippocampal formation and parahippocampal cortex in the rhesus monkey. *Neuroscience* 12:719-743.

Gorelova N, Seamans JK, Yang CR (2002) Mechanisms of dopamine activation of fast-spiking interneurons that exert inhibition in rat prefrontal cortex. *Journal of neurophysiology* 88:3150-3166.

Green MF (2006) Cognitive impairment and functional outcome in schizophrenia and bipolar disorder. *The Journal of clinical psychiatry* 67:e12.

Gulledge AT, Jaffe DB (1998) Dopamine decreases the excitability of layer V pyramidal cells in the rat prefrontal cortex. *The Journal of neuroscience : the official journal of the Society for Neuroscience* 18:9139-9151.

Hart RP, Martelli MF, Zasler ND (2000) Chronic pain and neuropsychological functioning. *Neuropsychology review* 10:131-149.

Heidbreder CA, Groenewegen HJ (2003) The medial prefrontal cortex in the rat: evidence for a dorso-ventral distinction based upon functional and anatomical characteristics. *Neuroscience and biobehavioral reviews* 27:555-579.

Henze DA, Gonzalez-Burgos GR, Urban NN, Lewis DA, Barrionuevo G (2000) Dopamine increases excitability of pyramidal neurons in primate prefrontal cortex. *Journal of neurophysiology* 84:2799-2809.

Homayoun H, Moghaddam B (2007) NMDA receptor hypofunction produces opposite effects on prefrontal cortex interneurons and pyramidal neurons. *The Journal of neuroscience : the official journal of the Society for Neuroscience* 27:11496-11500.

Hu Y, Yang J, Hu Y, Wang Y, Li W (2010) Amitriptyline rather than lornoxicam ameliorates neuropathic pain-induced deficits in abilities of spatial learning and memory. *European journal of anaesthesiology* 27:162-168.

Hunter WS (1913) The delayed reaction in animals and children. *Behav Monogr* 2:1-103.

Hurley KM, Herbert H, Moga MM, Saper CB (1991) Efferent projections of the infralimbic cortex of the rat. *The Journal of comparative neurology* 308:249-276.

Hyman JM, Zilli EA, Paley AM, Hasselmo ME (2005) Medial prefrontal cortex cells show dynamic modulation with the hippocampal theta rhythm dependent on behavior. *Hippocampus* 15:739-749.

Hyman JM, Zilli EA, Paley AM, Hasselmo ME (2010) Working Memory Performance Correlates with Prefrontal-Hippocampal Theta Interactions but not with Prefrontal Neuron Firing Rates. *Frontiers in integrative neuroscience* 4:2.

Jay TM, Witter MP (1991) Distribution of hippocampal CA1 and subicular efferents in the prefrontal cortex of the rat studied by means of anterograde transport of Phaseolus vulgaris-leucoagglutinin. *The Journal of comparative neurology* 313:574-586.

Jay TM, Glowinski J, Thierry AM (1989) Selectivity of the hippocampal projection to the prelimbic area of the prefrontal cortex in the rat. *Brain research* 505:337-340.

Ji G, Sun H, Fu Y, Li Z, Pais-Vieira M, Galhardo V, Neugebauer V (2010) Cognitive impairment in pain through amygdala-driven prefrontal cortical deactivation. *The Journal of neuroscience : the official journal of the Society for Neuroscience* 30:5451-5464.

Jones MW, Wilson MA (2005) Phase precession of medial prefrontal cortical activity relative to the hippocampal theta rhythm. *Hippocampus* 15:867-873.

Jung MW, Qin Y, McNaughton BL, Barnes CA (1998) Firing characteristics of deep layer neurons in prefrontal cortex in rats performing spatial working memory tasks. *Cerebral cortex* 8:437-450.

Karl T, Duffy L, O'Brien E, Matsumoto I, Dedova I (2006) Behavioural effects of chronic haloperidol and risperidone treatment in rats. *Behavioural brain research* 171:286-294.

Kim SH, Kim SK, Nam EJ, Han SW, Lee SJ (2012) Spatial versus verbal memory impairments in patients with fibromyalgia. *Rheumatology international* 32:1135-1142.

Kyd RJ, Bilkey DK (2003) Prefrontal cortex lesions modify the spatial properties of hippocampal place cells. *Cerebral cortex* 13:444-451.

Laroche S, Jay TM, Thierry AM (1990) Long-term potentiation in the prefrontal cortex following stimulation of the hippocampal CA1/subicular region. *Neuroscience letters* 114:184-190.

Lee I, Kesner RP (2003) Time-dependent relationship between the dorsal hippocampus and the prefrontal cortex in spatial memory. *The Journal of neuroscience : the official journal of the Society for Neuroscience* 23:1517-1523.

Leite-Almeida H, Almeida-Torres L, Mesquita AR, Pertovaara A, Sousa N, Cerqueira JJ, Almeida A (2009) The impact of age on emotional and cognitive behaviours triggered by experimental neuropathy in rats. *Pain* 144:57-65.

Lewis DA, Gonzalez-Burgos G (2006) Pathophysiologically based treatment interventions in schizophrenia. *Nature medicine* 12:1016-1022.

Lewis DA, Hashimoto T, Volk DW (2005) Cortical inhibitory neurons and schizophrenia. *Nature reviews Neuroscience* 6:312-324.

Lidow MS, Goldman-Rakic PS, Gallager DW, Rakic P (1991) Distribution of dopaminergic receptors in the primate cerebral cortex: quantitative autoradiographic analysis using [3H]raclopride, [3H]spiperone and [3H]SCH23390. *Neuroscience* 40:657-671.

Lindner MD, Plone MA, Francis JM, Cain CK (1999) Chronic morphine reduces pain-related disability in a rodent model of chronic, inflammatory pain. *Experimental and clinical psychopharmacology* 7:187-197.

Lisman J (2010) Working memory: the importance of theta and gamma oscillations. *Current biology : CB* 20:R490-492.

Lopez-Avila A, Coffeen U, Ortega-Legaspi JM, del Angel R, Pellicer F (2004) Dopamine and NMDA systems modulate long-term nociception in the rat anterior cingulate cortex. *Pain* 111:136-143.

Luerding R, Weigand T, Bogdahn U, Schmidt-Wilcke T (2008) Working memory performance is correlated with local brain morphology in the medial frontal and anterior cingulate cortex in fibromyalgia patients: structural correlates of pain-cognition interaction. *Brain : a journal of neurology* 131:3222-3231.

- Luo L, Callaway EM, Svoboda K (2008) Genetic dissection of neural circuits. *Neuron* 57:634-660.
- Markram H, Toledo-Rodriguez M, Wang Y, Gupta A, Silberberg G, Wu C (2004) Interneurons of the neocortical inhibitory system. *Nature reviews Neuroscience* 5:793-807.
- McDowell S, Whyte J, D'Esposito M (1997) Working memory impairments in traumatic brain injury: evidence from a dual-task paradigm. *Neuropsychologia* 35:1341-1353.
- Miner LA, Ostrander M, Sarter M (1997) Effects of ibotenic acid-induced loss of neurons in the medial prefrontal cortex of rats on behavioral vigilance: evidence for executive dysfunction. *Journal of psychopharmacology* 11:169-178.
- Moriarty O, McGuire BE, Finn DP (2011) The effect of pain on cognitive function: a review of clinical and preclinical research. *Progress in neurobiology* 93:385-404.
- Morris RJM (1981) Spatial localization does not require the presence of local cues. *Learning and Motivation* 12:239-260.
- Murphy BL, Arnsten AF, Goldman-Rakic PS, Roth RH (1996) Increased dopamine turnover in the prefrontal cortex impairs spatial working memory performance in rats and monkeys. *Proc Natl Acad Sci U S A* 93:1325-1329.
- Nagel G, Ollig D, Fuhrmann M, Kateriya S, Musti AM, Bamberg E, Hegemann P (2002) Channelrhodopsin-1: a light-gated proton channel in green algae. *Science* 296:2395-2398.
- Nagel G, Szellas T, Huhn W, Kateriya S, Adeishvili N, Berthold P, Ollig D, Hegemann P, Bamberg E (2003) Channelrhodopsin-2, a directly light-gated cation-selective membrane channel. *Proc Natl Acad Sci U S A* 100:13940-13945.
- Nakamura S, Baratta MV, Pomrenze MB, Dolzani SD, Cooper DC (2012) High fidelity optogenetic control of individual prefrontal cortical pyramidal neurons in vivo. *F1000Research* 1:7.
- Olton DSS, R.J. (1976) Remembrance of places passed: spatial memory in rats. *J Exp Psychol: Anim Behav Process*:97-116.
- Ongur D, Price JL (2000) The organization of networks within the orbital and medial prefrontal cortex of rats, monkeys and humans. *Cerebral cortex* 10:206-219.

Pais-Vieira M, Mendes-Pinto MM, Lima D, Galhardo V (2009) Cognitive impairment of prefrontal-dependent decision-making in rats after the onset of chronic pain. *Neuroscience* 161:671-679.

Park DC, Glass JM, Minear M, Crofford LJ (2001) Cognitive function in fibromyalgia patients. *Arthritis and rheumatism* 44:2125-2133.

Park S, Holzman PS (1992) Schizophrenics show spatial working memory deficits. *Archives of general psychiatry* 49:975-982.

Passetti F, Chudasama Y, Robbins TW (2002) The frontal cortex of the rat and visual attentional performance: dissociable functions of distinct medial prefrontal subregions. *Cerebral cortex* 12:1254-1268.

Passetti F, Humby T, Everitt BJ, Robbins TW (2000) Mixed attentional and executive deficits in medial frontal cortex lesioned rats. *Psychobiology* 28:261-271.

Paxinos G, Watson C (1998) *The Rat Brain in Stereotaxic Coordinates*, 4th Edition
Edition: Academic Press.

Povysheva NV, Gonzalez-Burgos G, Zaitsev AV, Kroner S, Barrionuevo G, Lewis DA, Krimer LS (2006) Properties of excitatory synaptic responses in fast-spiking interneurons and pyramidal cells from monkey and rat prefrontal cortex. *Cerebral cortex* 16:541-552.

Rao A, Cha EM, Craig AM (2000a) Mismatched appositions of presynaptic and postsynaptic components in isolated hippocampal neurons. *The Journal of neuroscience : the official journal of the Society for Neuroscience* 20:8344-8353.

Rao SG, Williams GV, Goldman-Rakic PS (2000b) Destruction and creation of spatial tuning by disinhibition: GABA(A) blockade of prefrontal cortical neurons engaged by working memory. *The Journal of neuroscience : the official journal of the Society for Neuroscience* 20:485-494.

Reep RL, Corwin JV, Hashimoto A, Watson RT (1987) Efferent connections of the rostral portion of medial agranular cortex in rats. *Brain research bulletin* 19:203-221.

Ren WJ, Liu Y, Zhou LJ, Li W, Zhong Y, Pang RP, Xin WJ, Wei XH, Wang J, Zhu HQ, Wu CY, Qin ZH, Liu G, Liu XG (2011) Peripheral nerve injury leads to working memory deficits and dysfunction of the hippocampus by upregulation of TNF-alpha in rodents.

Neuropsychopharmacology : official publication of the American College of Neuropsychopharmacology 36:979-992.

Room P, Russchen FT, Groenewegen HJ, Lohman AH (1985) Efferent connections of the prelimbic (area 32) and the infralimbic (area 25) cortices: an anterograde tracing study in the cat. The Journal of comparative neurology 242:40-55.

Rossi MA, Hayrapetyan VY, Maimon B, Mak K, Je HS, Yin HH (2012) Prefrontal cortical mechanisms underlying delayed alternation in mice. Journal of neurophysiology 108:1211-1222.

Saab CY (2012) Pain-related changes in the brain: diagnostic and therapeutic potentials. Trends in neurosciences 35:629-637.

Sakmar TP (2002) Structure of rhodopsin and the superfamily of seven-helical receptors: the same and not the same. Current opinion in cell biology 14:189-195.

Sawaguchi T, Goldman-Rakic PS (1991) D1 dopamine receptors in prefrontal cortex: involvement in working memory. Science 251:947-950.

Sawaguchi T, Goldman-Rakic PS (1994) The role of D1-dopamine receptor in working memory: local injections of dopamine antagonists into the prefrontal cortex of rhesus monkeys performing an oculomotor delayed-response task. Journal of neurophysiology 71:515-528.

Schobert B, Lanyi JK (1982) Halorhodopsin is a light-driven chloride pump. J Biol Chem 257:10306-10313.

Seamans JK, Floresco SB, Phillips AG (1995) Functional differences between the prelimbic and anterior cingulate regions of the rat prefrontal cortex. Behavioral neuroscience 109:1063-1073.

Seamans JK, Floresco SB, Phillips AG (1998) D1 receptor modulation of hippocampal-prefrontal cortical circuits integrating spatial memory with executive functions in the rat. The Journal of neuroscience : the official journal of the Society for Neuroscience 18:1613-1621.

Sesack SR, Deutch AY, Roth RH, Bunney BS (1989) Topographical organization of the efferent projections of the medial prefrontal cortex in the rat: an anterograde tract-tracing

study with Phaseolus vulgaris leucoagglutinin. The Journal of comparative neurology 290:213-242.

Shaw C, Aggleton JP (1993) The effects of fornix and medial prefrontal lesions on delayed non-matching-to-sample by rats. Behavioural brain research 54:91-102.

Shichida Y, Yamashita T (2003) Diversity of visual pigments from the viewpoint of G protein activation--comparison with other G protein-coupled receptors. Photochemical & photobiological sciences : Official journal of the European Photochemistry Association and the European Society for Photobiology 2:1237-1246.

Siapas AG, Lubenov EV, Wilson MA (2005) Prefrontal phase locking to hippocampal theta oscillations. Neuron 46:141-151.

Sirota A, Montgomery S, Fujisawa S, Isomura Y, Zugaro M, Buzsaki G (2008) Entrainment of neocortical neurons and gamma oscillations by the hippocampal theta rhythm. Neuron 60:683-697.

Sitskoorn MM, Aleman A, Ebisch SJ, Appels MC, Kahn RS (2004) Cognitive deficits in relatives of patients with schizophrenia: a meta-analysis. Schizophrenia research 71:285-295.

Sotres-Bayon F, Torres-Lopez E, Lopez-Avila A, del Angel R, Pellicer F (2001) Lesion and electrical stimulation of the ventral tegmental area modify persistent nociceptive behavior in the rat. Brain research 898:342-349.

Sparta DR, Hovelso N, Mason AO, Kantak PA, Ung RL, Decot HK, Stuber GD (2014) Activation of prefrontal cortical parvalbumin interneurons facilitates extinction of reward-seeking behavior. The Journal of neuroscience : the official journal of the Society for Neuroscience 34:3699-3705.

Spudich JL (2006) The multitalented microbial sensory rhodopsins. Trends in microbiology 14:480-487.

Suzuki T, Amata M, Sakaue G, Nishimura S, Inoue T, Shibata M, Mashimo T (2007) Experimental neuropathy in mice is associated with delayed behavioral changes related to anxiety and depression. Anesthesia and analgesia 104:1570-1577, table of contents.

Swanson L (2003) Brain Maps: Structure of the Rat Brain, 3rd Edition Edition: Academic Press.

Tarantino IS, Sharp RF, Geyer MA, Meves JM, Young JW (2011) Working memory span capacity improved by a D2 but not D1 receptor family agonist. *Behavioural brain research* 219:181-188.

Tierney PL, Degenetais E, Thierry AM, Glowinski J, Gioanni Y (2004) Influence of the hippocampus on interneurons of the rat prefrontal cortex. *The European journal of neuroscience* 20:514-524.

Tolman EC (1925) Purpose and cognition: the determiners of animal learning. *Psychological review* 32:285-297.

Tseng KY, O'Donnell P (2004) Dopamine-glutamate interactions controlling prefrontal cortical pyramidal cell excitability involve multiple signaling mechanisms. *The Journal of neuroscience : the official journal of the Society for Neuroscience* 24:5131-5139.

Tseng KY, O'Donnell P (2007) D2 dopamine receptors recruit a GABA component for their attenuation of excitatory synaptic transmission in the adult rat prefrontal cortex. *Synapse* 61:843-850.

Van De Werd HJ, Rajkowska G, Evers P, Uylings HB (2010) Cytoarchitectonic and chemoarchitectonic characterization of the prefrontal cortical areas in the mouse. *Brain structure & function* 214:339-353.

Vertes RP (2004) Differential projections of the infralimbic and prelimbic cortex in the rat. *Synapse* 51:32-58.

Vertes RP (2006) Interactions among the medial prefrontal cortex, hippocampus and midline thalamus in emotional and cognitive processing in the rat. *Neuroscience* 142:1-20.

Vincent SL, Khan Y, Benes FM (1993) Cellular distribution of dopamine D1 and D2 receptors in rat medial prefrontal cortex. *The Journal of neuroscience : the official journal of the Society for Neuroscience* 13:2551-2564.

Wang GW, Cai JX (2006) Disconnection of the hippocampal-prefrontal cortical circuits impairs spatial working memory performance in rats. *Behavioural brain research* 175:329-336.

Wood PB (2008) Role of central dopamine in pain and analgesia. *Expert review of neurotherapeutics* 8:781-797.

Yang ST, Shi Y, Wang Q, Peng JY, Li BM (2014) Neuronal representation of working memory in the medial prefrontal cortex of rats. *Molecular brain* 7:61.

Yizhar O, Fenno LE, Prigge M, Schneider F, Davidson TJ, O'Shea DJ, Sohal VS, Goshen I, Finkelstein J, Paz JT, Stehfest K, Fudim R, Ramakrishnan C, Huguenard JR, Hegemann P, Deisseroth K (2011) Neocortical excitation/inhibition balance in information processing and social dysfunction. *Nature* 477:171-178.

Yoon T, Okada J, Jung MW, Kim JJ (2008) Prefrontal cortex and hippocampus subserve different components of working memory in rats. *Learning & memory* 15:97-105.

Zahrt J, Taylor JR, Mathew RG, Arnsten AF (1997) Supranormal stimulation of D1 dopamine receptors in the rodent prefrontal cortex impairs spatial working memory performance. *The Journal of neuroscience : the official journal of the Society for Neuroscience* 17:8528-8535.

Zhang F, Gradinaru V, Adamantidis AR, Durand R, Airan RD, de Lecea L, Deisseroth K (2010) Optogenetic interrogation of neural circuits: technology for probing mammalian brain structures. *Nat Protoc* 5:439-456.

Zimmermann M (1983) Ethical guidelines for investigations of experimental pain in conscious animals. *Pain* 16:109-110.